

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně citovat.

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



**Ing. Martin Obr**

NMR struktura N-terminální domény kapsidového proteinu Mason-Pfizerova opičího viru  
nesoucí mutaci narušující skládání kapsidy

NMR structure of an assembly defective mutant of the N-terminal domain of the capsid  
protein from Mason-Pfizer monkey virus

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Dr.Ing. Michaela Rumlová

Praha, 2013

Tato práce byla sponzorována grantem GA ČR 204/09/1388

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 6.5.2013

Podpis

# PODĚKOVÁNÍ

*Děkuji Dr.Ing. Michaele Rumlové za laskavost, péči a pozornost, kterou věnovala mé práci. Děkuji Ing. Michalu Doležalovi a Mgr. Veronice Papouškové PhD. za pomoc s praktickými aspekty NMR techniky. Děkuji Ing. Ivě Pichové, CSc., Doc. Richardu Hrabalovi a Prof. RNDr. Vladimíru Sklenářovi, DrSc. za možnost podílet se na tomto multidisciplinárním projektu. Moje poděkování patří také všem ostatním členům laboratoře 4.10 a 4.11 za vytvoření skvělého pracovního prostředí.*

*Děkuji svým rodičům, jejichž soustavná podpora mi velmi pomohla při dosažení vzdělání i osobních cílů.*

## ABSTRAKT

Během procesu zrání retrovirových částic je polyproteinový prekurzor Gag rozštěpen virovou proteasou na jednotlivé funkční komponenty – matrixový protein (MA), kapsidový protein (CA) a nukleokapsidový protein (NC). Kapsidový protein se skládá ze dvou domén N-terminální (NTD) a C-terminální (CTD) a vytváří multimerní proteinovou síť. Konformační změna po uvolnění CA umožňuje rozpustit nezralou síť a vytvořit zralou virovou kapsidu.

Trojrozměrná struktura CA NTD M-PMV obsahuje 6  $\alpha$ -helixů a N-terminální  $\beta$ -smyčku.  $\beta$ -smyčka se vytváří po uvolnění N-konce CA z prekurzoru interakcí mezi Pro1 a Asp57 a dalším nespecifikovaným rozhraním mezi Arg14 a helixem 5. Tvorba  $\beta$ -smyčky je nezbytným předpokladem pro vznik zralé sítě CA.

Tato diplomová práce analyzuje vliv bodových mutací D111N (helix 5) a R14K ( $\beta$ -smyčka) na strukturu CANTD pomocí NMR spektroskopie. V případě obou mutací nebyl pozorován vliv na celkové sbalení proteinu. Porovnáním NOE kontaktů CANTD D111N s divokým typem byla prokázána strukturní identita těchto proteinů. CANTD R14K se od divokého typu odlišoval výraznějším způsobem, především v oblastech  $\beta$ -smyčky a helixu 5. Výsledky této strukturní studie potvrzují existenci stabilizačního rozhraní mezi  $\beta$ -smyčkou a helixem 5, s Arg14 jako klíčovým prvkem této stabilizace. Kontakt mezi Arg14 a Asp111 byl vyloučen a byli identifikováni jiní možní interakční partneři Arg14.

**Klíčová slova:** retrovirus, NMR, kapsidový protein, M-PMV, proteinová struktura, skládání.

## ABSTRACT

Retroviral polyprotein precursor Gag is cleaved by viral protease during the course of virus particle maturation to yield individual structural components – matrix protein (MA), capsid protein (CA) and nucleocapsid protein (NC). CA consists of two domains: N-terminal (NTD) and C-terminal (CTD) and forms a hexameric lattice. Conformational switch upon proteolytic release of CA mediates disassembly of an immature and assembly of a mature capsid.

3D structure of M-PMV CANTD consists of six  $\alpha$ -helices and N-terminal  $\beta$ -hairpin. The  $\beta$ -hairpin is stabilized by a salt bridge between Pro1 and Asp57 and another, yet uncharacterized interface between Arg14 and helix 5. Proper  $\beta$ -hairpin formation is critical for mature particle assembly.

This thesis analyses the impact of the helix 5 and  $\beta$ -hairpin point mutations (D111N and R14K, respectively) on the CANTD structure by NMR spectroscopy. None of the mutations affect overall fold of the protein. Comparison of NOE contacts of WT and D111N indicates structural identity of these proteins. R14K mutation shows significant changes in the helix 5 and the  $\beta$ -hairpin regions in comparison with WT. These results confirm presence of the interface stabilized by  $\beta$ -hairpin and helix 5 interactions, with Arg14 being the critical part. Role of Asp111 in this interface was not confirmed and other possible interacting partners of Arg14 have been revealed.

Key words: retrovirus, NMR, capsid protein, M-PMV, protein structure, assembly.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>PŘEHLED LITERATURY .....</b>	<b>13</b>
3.1	RETROVIRY V BIOLOGICKÝCH VĚDÁCH .....	13
3.2	KLASIFIKACE RETROVIRŮ .....	14
3.3	SKLADBA A VLASTNOSTI VIROVÝCH ČÁSTIC .....	17
3.4	GENOM RETROVIRŮ .....	19
3.5	STRUKTURA A FUNKCE RETROVIROVÝCH PROTEINŮ .....	21
3.5.1	Strukturní proteiny .....	21
3.5.2	Virové enzymy .....	24
3.5.3	Obalové glykoproteiny .....	26
3.6	ŽIVOTNÍ CYKLUS .....	27
3.6.1	Vstup do buňky a tropismus .....	28
3.6.2	Role virové kapsidy a jejího rozpadu během časných událostí .....	29
3.6.3	Reverzní transkripce .....	30
3.6.4	Cytoplasmatický a jaderný transport .....	31
3.6.5	Integrace .....	32
3.6.6	Transkripční regulace a latence .....	32
3.6.7	Translace virového proteomu a její regulace .....	33
3.6.8	Morfogeneze virových částic .....	35
3.7	SKLÁDÁNÍ A ZRÁNÍ VIROVÝCH ČÁSTIC .....	37
3.7.1	<i>In vitro</i> skládání .....	37
3.7.2	Prekurzor Gag: organizátor skládání virové částice .....	39
3.7.3	Architektura nezralé částice .....	40
3.7.4	Maturace .....	41
3.7.5	Zralá částice .....	42
3.8	TERCIÁRNÍ STRUKTURA CA NTD M-PMV A DALŠÍCH RETROVIRŮ .....	45
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>47</b>
4.1	MATERIÁL .....	47
4.1.1	Chemikálie .....	47

4.1.2	Enzymy a proteiny .....	48
4.1.3	Komerční kity .....	48
4.1.4	Buňky, plasmidy a oligonukleotidy .....	48
4.1.5	Roztoky a média .....	49
4.1.6	Přístrojové vybavení .....	51
4.2	METODY .....	53
4.2.1	DNA metody .....	53
4.2.2	Manipulace s proteiny .....	55
4.2.3	NMR spektroskopie .....	57
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>64</b>
5.1	VÝBĚR MUTACÍ V CA NTD PRO STRUKTURNÍ ANALÝZU .....	64
5.2	PŘÍPRAVA VEKTORŮ PRO EXPRESI CA NTD .....	65
5.3	EXPRESE, IZOLACE A PURIFIKACE CA NTD .....	66
5.4	PŘÍŘAZENÍ CHEMICKÝCH POSUNŮ .....	68
5.4.1	Přiřazení chemických posunů atomů proteinové páteře .....	68
5.4.2	Přiřazení chemických posunů atomů postranních řetězců .....	71
5.5	POROVNÁNÍ NOESY SPEKTRA DIVOKÉHO TYPU A D111N .....	71
5.6	TEPLOTNÍ A PH ZÁVISLOST CHEMICKÝCH POSUNŮ .....	75
5.7	$^1\text{H}$ - $^2\text{H}$ VÝMĚNA .....	75
<b>6</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>SOUHRN .....</b>	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>83</b>



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AFM –	<i>mikroskopie atomárních sil</i>
AIDS –	<i>syndrom získané imunodeficiency</i>
BLV –	<i>bovine leukemia virus</i>
CA –	<i>kapsidový protein</i>
CTD –	<i>C-terminální doména</i>
CTR –	<i>cytoplasmic targeting/retention</i>
DLS –	<i>dimer linkage sequence</i>
DOC –	<i>deoxycholová kyselina</i>
DTT –	<i>dithiothreitol</i>
EDTA –	<i>bovine leukemia virus</i>
EIAV –	<i>equine infectious anemia virus</i>
Env –	<i>Envelope polyprotein</i>
FDA –	<i>Úřad pro kontrolu potravin a léčiv</i>
FPLC –	<i>fast protein liquid chromatography</i>
HAART –	<i>highly active anti-retroviral therapy</i>
HBR –	<i>highly basic region</i>
HFV –	<i>lidský spumavirus</i>
HIV –	<i>virus lidské imunodeficiency</i>
HTLV –	<i>human T-lymphotropic leukemia virus</i>
IAP –	<i>intracisternal type-A particle</i>
IN –	<i>integrasa</i>
IPTG –	<i>isopropyl-D-thiogalaktopyranosid</i>
JRSV –	<i>Jaagsiekte sheep retrovirus</i>
LTR –	<i>long terminal repeat</i>
MA –	<i>matrixový protein</i>
MHR –	<i>major homology region</i>
MLV –	<i>murine leukemia virus</i>
MMTV –	<i>mouse mammary tumor virus</i>
M-PMV –	<i>Mason-Pfizerův opičí virus</i>
MTOC –	<i>organizační centrum mikrotubulů</i>
BLV –	<i>bovine leukemia virus</i>

NC –	<i>nukleokapsidový protein</i>
NMR –	<i>nukleární magnetická resonance</i>
OD –	<i>optická densita</i>
PAGE –	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS –	<i>primer binding site</i>
PCE –	<i>post-transcriptional control element</i>
PCR –	<i>polymerase chain reaction</i>
Pfu –	<i>plaque-forming unit</i>
PIC –	<i>preintegrační komplex</i>
Pol –	<i>polyproten obsahující virové enzymy</i>
PPT –	<i>polypurinový trakt</i>
PR –	<i>proteasa</i>
RCF –	<i>odstředivé zrychlení</i>
RPM –	<i>otáčky za minutu</i>
RSV –	<i>Rous sarcoma virus</i>
RT –	<i>reverzní transkriptasa</i>
RTC –	<i>reverzně-transkribující komplex</i>
SIV –	<i>simian immunodeficiency virus</i>
SU –	<i>povrchový glykoprotein</i>
UTR –	<i>untranslated region</i>
TM –	<i>transmembránový protein</i>
VLP –	<i>virus-like particle</i>
XMRV –	<i>xenotropic murine leukemia virus-related virus</i>

# 1 ÚVOD

Virus lidské imunodeficiency (HIV) a jím vyvolané onemocnění AIDS je aktuálně třetí nejčastější příčinou úmrtí v rozvojových zemích a patří mezi deset nejčastějších v celosvětovém měřítku. Každý rok přibudou přibližně 3 miliony nově nakažených, a zhruba 2 miliony následkům tohoto onemocnění podlehnou ([http://www.who.int/gho/mortality\\_burden\\_disease/causes\\_death/2008/en/index.html](http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/2008/en/index.html); staženo 24.1.2013). Největší problém představuje tato choroba v rozvojových zemích zejména v Africe, kde je kvůli nízké životní úrovni nedostatek prostředků na prevenci a léčbu. Nicméně ani v zemích s moderní zdravotní péčí zatím neexistuje očkování ani efektivní a dostupný způsob, jak toto onemocnění zcela vyléčit.

Stávající léčba je zaměřena především na to, jak znemožnit či omezit množení HIV a tím co nejvíce zpomalit nástup a progresi AIDS. V současné době je dle Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) schváleno k použití 36 originálních léčivých přípravků pro léčbu onemocnění AIDS. V nich obsažené účinné látky jsou inhibitory enzymů HIV – reverzní transkriptasy, proteasy a integrasy a neenzymatických dějů životního cyklu – vstupu a fúze (<http://www.fda.gov/ForConsumers/byAudience/forPatientAdvocates/HIVandAIDSactivities/ucm118915.htm>; staženo 24.1.2013). Nejúčinnějším přístupem pro léčbu HIV/AIDS je tzv. HAART (highly active anti-retroviral therapy), jehož principem je podávání několika (typicky třech nebo čtyřech) inhibitorů najednou.

HIV patří mezi zástupce čeledi *Retroviridae*, jejichž typickými znaky jsou integrace do genomu hostitele, reverzní transkripce virového genomu a dlouhé období latence. Praktickým důsledkem těchto znaků jsou v tomto pořadí celoživotní přetrvávání patogenu v organismu, častá frekvence mutací ve virovém genomu podmiňující vznik mnohačetných rezistencí vůči lékům a neblahé důsledky pro epidemiologii AIDS. Z těchto důvodů je účelné hledat další potenciální terapeutické cíle. Dalším dějem životního cyklu retrovirů, který je v principu možné zablokovat, je skládání a rozpad virové kapsidy.

Přestože se převážná část výzkumu retrovirů koncentruje na HIV, v určitých případech je možné, či dokonce výhodné, zkoumat jiného zástupce retrovirů. Mason-Pfizerův opičí virus (M-PMV) je modelovým zástupcem rodu *Betaretrovirus*. Ačkoliv u opic může vyvolat onemocnění podobné AIDS, pro člověka není infekční. Skládání

virových částic probíhá u M-PMV v cytoplasmě na rozdíl od HIV, u kterého probíhá na cytoplasmatické membráně. Díky tomu, že skládání, pučení a zrání virové částice jsou místně a časově odděleny, je možné tyto procesy odděleně studovat. Z těchto důvodů je M-PMV skvělým modelem pro studium skládání retrovirových částic.

Kapsidový protein (CA) je nezbytným stavebním prvkem pro skládání retrovirových částic. Skládá se ze dvou strukturně izolovaných domén, N-terminální (CANTD) a C-terminální (CACTD). Trojrozměrná struktura divokého typu CANTD M-PMV byla vyřešena pomocí NMR v r. 2009. Tato struktura ukazuje prostorové uspořádání molekuly a hlavní intramolekulární interakce, které toto uspořádání udržují. Z této struktury také vyplývá pravděpodobná přítomnost dalších podpůrných interakcí nutných pro složení funkčních částic, jejichž význam je třeba ještě dále prozkoumat.

Náplní této diplomové práce je studium strukturních změn CA NTD M-PMV vyvolaných mutacemi, které mají negativní efekt na skládání virové částice. Výběr mutací byl proveden na základě výsledků bakalářské práce Strukturně-funkční studie kapsidového proteinu M-PMV (Obr 2010) a diplomové práce Vliv mutací kapsidového proteinu na skládání virových částic M-PMV (Obr 2012), obou obhájených na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze. Cílem této diplomové práce je vyřešit 3D strukturu vybraného mutantu CA NTD M-PMV, což přispěje k prohloubení znalosti intramolekulárních interakcí udržujících assembly-kompetentní konformaci tohoto proteinu.

## 2 CÍLE PRÁCE

### Teoretická část

Vyhledat a zpracovat aktuální odborné materiály zabývající se skládáním retrovirových částic a strukturními proteiny retrovirů; a na základě těchto materiálů zpracovat literární rešerši.

### Experimentální část

Připravit plasmidové DNA pro expresi proteinu CANTD R14K a D111N.

Pomocí rekombinantní exprese v *E. coli* připravit proteiny CANTD R14K a D111N, značené izotopy  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ .

Purifikovat připravené proteiny.

Ověřit čistotu a správnost sbalení připravených proteinů.

Prozkoumat vliv mutací R14K a D111N na strukturu proteinu CANTD.

### 3 PŘEHLED LITERATURY

Čeď *Retroviridae* představuje skupinu obalených RNA virů, které během rozmnožování využívají reverzní transkriptasu (RT). Spolu s integrasou, dalším enzymem charakteristickým pro tuto čeď, umožňují trvale integrovat kopii virového genomu do genomu hostitele v podobě tzv. proviru. Retroviry, napadající rozličné druhy obratlovců, se vyznačují vysokou druhovou specifitou a u svých hostitelů vyvolávají nádorová nebo imunitní onemocnění.

#### 3.1 Retroviry v biologických vědách

Objevy v oblasti retrovirů v minulosti často znamenaly velký průlom i pro příbuzné obory a nejednou posunuly hranice vědění v biologii, medicíně a molekulární genetice výrazně dopředu. Výsledky výzkumu v oboru retrovirologie přepsaly molekulárně biologické axiomy, obohatily experimentální techniky a promítly se do početných biotechnologických aplikací.

V době, kdy ještě nebylo známo, jakým způsobem se retroviry rozmnožují, byli někteří jejich zástupci zkoumáni zejména pro své tumorogenní vlastnosti. Výzkum retrovirové onkogeneze položil základy pro studium regulace buněčného růstu a pomohl objevit protoonkogeny, v normálním případě fungující jako proteiny zapojené do buněčných regulačních drah. K porozumění regulaci buněčného cyklu, diferenciaci a aberantnímu růstu rakovinných buněk velkou měrou přispěly regulační proteiny, poprvé identifikované ve vysoce onkogenních retrovirech (Vogt, 1997a).

Objev reverzní transkriptasy (Baltimore 1970; Temin a Mizutani, 1970) znamenal revoluci pro koncept genetické informace, její molekulární podstaty a módu jejího přenosu, a vyžádal si aktualizaci centrálního dogmatu molekulární genetiky. RT našla uplatnění i v laboratorní praxi a rozšířila výčet nástrojů pro manipulaci s nukleovými kyselinami. Analýza buněčných transkriptů a příprava cDNA knihoven jsou nejdůležitější techniky, které byly umožněny s využitím tohoto enzymu.

Retroviry ve stádiu proviru je možné považovat za transponovatelné nebo-li mobilní elementy DNA. Transponovatelné DNA elementy využívající reverzní transkriptasu (retrotranspozony) nemusejí být pouze virového původu a jsou přítomny v genomu rozličných druhů včetně hmyzu a rostlin. U člověka zauímají zhruba 30-40% genomu. Ukazuje se, že mobilní DNA elementy včetně těch

retrovirového původu sehrávají v evoluci velmi důležitou roli. Z analýz těchto sekvencí vyplynulo mnoho informací o vývoji, migraci a diferenciaci druhů (Larsson, 1998).

Velký potenciál slibuje využití retrovirových vektorů v genových terapiích. Integrace do genomu zaručuje stabilní expresi terapeutického genu v transformovaných buňkách i jejich potomstvu. Avšak teprve v současné době jsou objevovány zákonitosti výběru místa pro integraci a dosud není možné provést tento proces řízeně. Z toho důvodu, i přes několik pozitivních výsledků v klinických testech, není použití retrovirů v genových terapiích v současné době povoleno.

Prvním lidským objeveným retrovirem byl HTLV-1 v roce 1981. Mnohem větší pozornost nejen vědeckého světa ale upoutal objev HIV o rok později. Souvislost mezi HIV a AIDS vyvolala masivní příliv hmotných prostředků a lidských sil do oboru retrovirologie. HIV je od té doby největším motorem retrovirologického výzkumu.

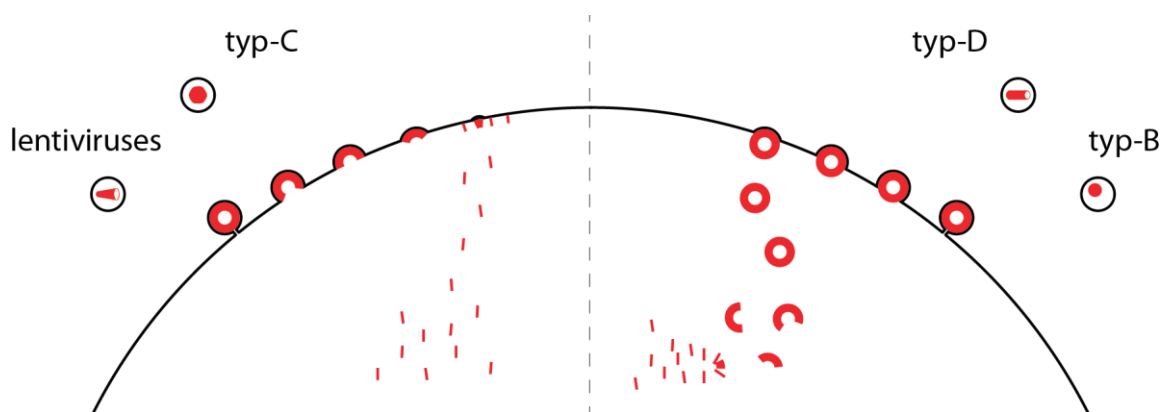
### **3.2 Klasifikace retrovirů**

Retroviry je možné rozdělit do kategorií několika způsoby podle různých kritérií. Pokud retrovirus tvoří virové částice a je schopen extracelulární existence, hovoříme o exogenním retroviru. V případě, že dojde k infekci embryonálních buněk, může se retrovirus šířit nejen horizontálně, ale i vertikálně, tedy na potomstvo hostitele. Po určitém počtu generací se v sekvenci proviru naakumulují mutace a již se netvoří infekční virové částice. V takovém případě hovoříme o endogenním retroviru, který již není schopen horizontálního rozmnožování, a v zásadě se nejedná o virus v pravém slova smyslu, ale spíše o transponovatelný DNA element.

Podle složitosti genomu rozlišujeme zástupce s jednoduchým nebo komplexním genomem. Jednoduché retroviry zpravidla mají kratší genom, který obsahuje pouze základní retrovirové čtecí rámce *gag*, *pro*, *pol* a *env*. Jednoduché retroviry neprodukují vícenásobně sestřiženou RNA. Komplexní retroviry mohou mít genom o délce přes 10 kbp a kromě základních proteinů kódují i další doplňkové, které se podílejí především na regulaci syntézy, úpravy a exportu mRNA nebo na regulaci dalších buněčných dějů souvisejících s expresí virových genů. mRNA komplexních retrovirů obsahuje více sestřihových míst a tudíž může poskytnout několik různých transkriptů.

Podobná morfologie a morfogeneze některých zástupců umožňuje jejich klasifikaci na morfologické typy A-D, lentiviry a spumaviry. Klíčem k jejich rozlišování je především místo skládání a tvar virové kapsidy. U částic typu-B a -D probíhá skládání virové částice uvnitř cytoplasmy, zatímco v případě typu-C a lentivirů je skládání místně vázáno na cytoplasmatickou membránu (Obrázek 3-1). Morfologický typ-B má sférické zralé core excentricky uložené. Centrálně uložené core je v případě typu-C zaoblené nebo polyedrání, v případě typu-D tubulární a u lentivirů kónické. Speciálním případem jsou částice typu-A. Na elektronmikroskopických snímcích ultratenkých řezů jsou kolem elektron-lucentních středů částic typu-A koncentricky soustředěny jeden nebo dva elektron-densní prstence. Částice typu-A mohou být pozorovány intracelulárně ve dvou odlišných případech. Pokud částice nejsou obaleny membránou, jedná se o cytoplasmatické prekursorů částic morfologického typu-B nebo -D, které jsou transportovány k membráně, a po vypuštění dozrají v infekční virové částice. Druhým případem jsou tzv. IAP (intracisternal type-A particles) identifikované v buňkách hlodavců. Tyto obalené částice jsou produktem exprese endogenních retrovirů hlodavců. Tyto částice získají fosfolipidový obal tím, že vypuštějí do buněčných organel, především endoplasmatického retikula, kde se poté akumulují. Vzhledem k tomu, že částice extracelulárních virů s poruchou maturace vytvářejí na řezu také prstence, mohou být částice typu-A považovány za modelové nezralé částice. Spumaviry vytvářejí částice s morfologií značně odlišnou od ostatních extracelulárních retrovirů. Při maturaci nedochází ke kondenzaci virového jádra a viriony spumavirů proto připomínají částice typu-A. Membrána virionů je poseta velkým množstvím obalových glykoproteinů, které vytvářejí charakteristické ostny (Vogt, 1997b).





**Obrázek 3-1: Morfologické typy retrovirů.** Skládání retrovirových částic probíhá dvěma rozdílnými způsoby. Lentiviry a retroviry typu-C skládají nezralé částice na plasmatické membráně, zatímco retroviry typu-B a -D skládají nezralé částice v cytoplasmě.

Kritériem pro aktuální taxonomické členění retrovirů je genetická příbuznost. Čeleď *Retroviridae* obsahuje dvě podčeledi *Orthoretrovirinae* a *Spumavirinae*. Podčeleď *Orthovirinae* zahrnuje 6 rodů – *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus* a *Lentivirus*. Do podčeledi *Spumavirinae* patří jediný rod – *Spumavirus* (King *et al.*, 2011).

Zástupci rodu *Alpharetrovirus* jsou endogenní a exogenní retroviry ptáků, mají jednoduchý genom a patří do morfologického typu-C. Retroviry tohoto rodu u hostitele vyvolávají leukemie a sarkomy. Modelovým představitelem je Avian leukosis virus. Pro výzkum skládání retrovirových částic typu-C je stěžejní další zástupce alfaretrovirů, Rous sarcoma virus (RSV).

Mezi hostitele rodu *Betaretrovirus* patří myši, někteří primáti a ovce. Betaretroviry tvoří částice typu-B a -D. Typovým představitelem je Mouse mammary tumor virus (MMTV). Modelem skládání retrovirových částic typu-D je Mason-Pfizer monkey virus (M-PMV). M-PMV u svého hostitele, kterým je makak červený (*Macaca mulatta*), způsobuje vznik prsních karcinomů a může vyvolat také onemocnění imunitního systému podobné nemoci AIDS.

Rod *Gammaretrovirus* zahrnuje velkou skupinu retrovirů, jejichž hostitelé bývají nejčastěji myši, kočky a plazi. Z hlediska komplexity genomu a morfologie gammaretroviry klasifikujeme jako jednoduché, morfologického typu-C. Modelovým zástupcem je Murine leukemia virus (MLV), který se podle tropismu dělí na B-MLV a N-MLV. Xenotropic Murine leukemia virus-related virus (XMRV) je nedávno objeveným gammaretrovirem, který je spojován především s kontroverzí ohledně jím vyvolaných onemocnění u člověka. XMRV měl podle některých studií být původcem

chronického únavového systému či rakoviny prostaty. Následné studie ukázaly, že tento gammaretrovirus je kontaminace z myší buněčné linie a jedná se o endogenní retrovirus, kterých myší genom obsahuje velké množství.

Mezi zástupce deltaretrovirů patří komplexní retroviry morfologie typu-C, které jsou původci leukemie u primátů a skotu. Prototypem je Bovine leukemia virus. Dále sem patří jeden ze dvou retrovirů způsobujících onemocnění u člověka, Human T-lymphotropic virus (HTLV). Dosud nebyly objeveny žádné endogenní deltaretroviry.

*Epsilonretrovirus* je nejméně prozkoumaným retrovirovým rodem. Hostitelem epsilonretrovirů jsou ryby. Mezi zástupce patří Walleye dermal sarcoma virus a Walleye epidermal hyperplasia virus.

Charakteristickým znakem rodu *Lentivirus* je pomalý průběh infekce, z čehož vznikl i název rodu (*lentus* = pomalý). Genom lentivirů je komplexní, kódující početné doplňkové proteiny. Pouze u lentivirů není replikace vázána na buněčný cyklus a jejich životní cyklus může kompletně proběhnout v nedělicích se buňkách. Významnými zástupci jsou HIV-1, HIV-2 a SIV (Simian immunodeficiency virus). HIV-1 a HIV-2 nejsou různými kmeny stejného druhu, což je doloženo faktem, že nukleotidová sekvence HIV-2 je více příbuzná s SIV než s HIV-1. Přestože se HIV vyvinul z retrovirů afrických primátů, není přenosný přímo ze zvířete na člověka a SIV u opic způsobuje syndrom získané imunodeficiency jen ve vzácných případech.

Spumaviry jsou od ostatních retrovirů natolik odlišné, že jsou zařazeny do vlastní podčeledi. Rozdíly jsou patrné jak v morfologii, tak v některých aspektech replikace. Zástupci rodu *Spumavirus* vyvolávají v napadených tkáních cytopatické efekty vypadající jako pěna a z toho důvodu bývají označovány jako „foamy“ viry. Hostiteli spumavirů jsou rozliční obratlovci, jejichž výčet sahá od člověka, skotu přes opice, kočky a další. Modelovým představitelem je Simian foamy virus (Coffin *et al.*, 1997; Vogt, 1997b; Voevodin a Preston, 2009).

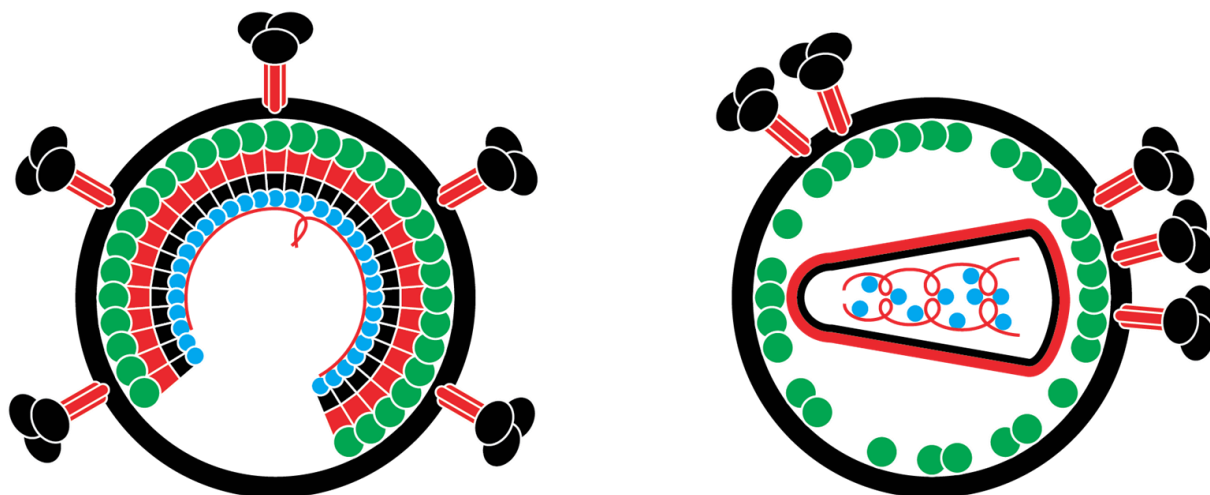
### **3.3 Skladba a vlastnosti virových částic**

Extracelulární virová částice neboli virion je organizována podobným způsobem u všech zástupců s výjimkou tvaru zralého core, což je atribut specifický pro daný retrovirový rod. Tvar virionu je sférický o poloměru 80-150 nm. Chemické složení suché hmoty virionu je tvořeno 65% proteinů, 30% lipidů, 3% sacharidů a 1-2% nukleových kyselin.

Během pučení viriony získávají fosfolipidovou obálku, která je složením odlišná od cytoplasmatické membrány. Zastoupení lipidů ve virové membráně reflektuje fakt, že vznikající virové částice preferenčně asociují s membránou a pučí v místech obsahujících velké množství sfingolipidů a cholesterolu, zvaných lipidové rafty. Většinu RNA ve virionu tvoří genomová RNA, ale nachází se zde také buněčná tRNA, která slouží jako primer pro reverzní transkripci, a rané transkripty.

Hustota virových částic je poměrně homogenní a pohybuje se okolo  $1,16 \text{ g/cm}^3$ , což umožňuje purifikovat viriony pomocí rovnovážné gradientové centrifugace. Jeden miligram virových částic jich obsahuje zhruba  $10^{12}$ , z čehož je možné určit průměrnou hmotnost jedné částice, pohybující se mezi  $10^8$ - $10^9$  Da. Počet virových částic na pfu je více než 100, což znamená, že méně než 1% extracelulárních retrovirových částic je schopno infikovat další buňku (Vogt, 1997b; Bannert *et al.*, 2010).

Rozdíly mezi zralou a nezralou virovou částicí jsou ukázány na Obrázek 3-2. V nezralé částici jsou virové proteiny přítomny jako součásti polyproteinových prekurzorů Gag a v menším množství Gag-Pro a Gag-Pro-Pol. Organizace prekurzoru Gag vykazuje sférickou symetrii. N-konec prekurzoru Gag je asociován s virovou membránou, zatímco C-konec je v kontaktu s RNA uvnitř virionu. Během procesu proteolytické maturace virová proteasa štěpí polyproteinové prekurzory na jednotlivé funkční jednotky. Následně se vnitřní prostor virionu přeskupí za vzniku zralé virové částice. Matrixový protein (MA) ve zralé částici tvoří výstelku virové membrány. Virové core složené z multimerní sítě kapsidového proteinu (CA) se nachází uvnitř viroplasmy a obsahuje ribonukleoproteinový komplex jednotek nukleokapsidového proteinu (NC) se dvěma vlákny virové RNA, virové enzymy: integrasu (IN), reverzní transkriptasu (RT), proteasu (PR) a doplňkové proteiny, pokud jsou přítomny (Swanstrom a Wills, 1997).

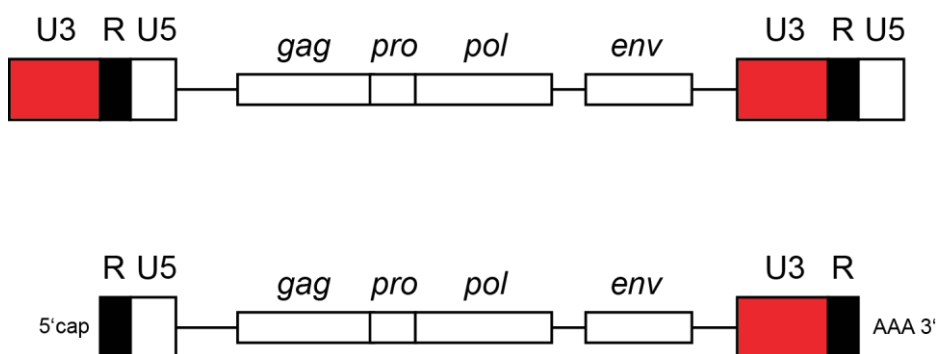


**Obrázek 3-2: Nezralá a zralá částice retrovirů.** Vlevo: V nezralé částici molekuly prekursoru Gag vystylají vnitřní povrch membrány. Vpravo: Po uvolnění z prekursoru CA vytváří zralou kapsidu obalující komplex genomové RNA s NC. MA zůstává v asociaci s virovou membránou.

### 3.4 Genom retrovirů

Virový genom sestává ze dvou identických vláken +ssRNA o délce 7-12 kbp. Virová RNA (vRNA) je stejně jako mRNA produkt eukaryotického transkripčního aparátu a jako taková obsahuje na 5' konci 7-methylguanosinovou čepičku ( $m^7G5'-ppp5'-G_mP$ ) a na 3' konci polyadenylační sekvenci dlouhou přibližně 200 nukleotidů. Důvodem, proč viriony retrovirů na rozdíl od ostatních virů nesou 2 kompletní kopie genomu, je zvýšení účinnosti transferů řetězce a tedy i celého procesu reverzní transkripce.

Transkribovaná část genomu obsahuje tři nebo čtyři základní otevřené čtecí rámce *gag*, *pro*, *pol* a *env*, které jsou ohraničeny regulačními sekvencemi nezbytnými pro reverzní transkripci, integraci provirové DNA do genomu hostitelské buňky, translaci a inkorporaci genomu do nascentního virionu. Regulační oblasti genomu, které jsou přítomny v transkriptu, ale neobsahují informaci pro syntézu polypeptidového řetězce, jsou nazvány UTR (untranslated region) a skládají se z elementů R a U5 (5'UTR) respektive U3 a R (3'UTR) (Obrázek 3-3).



**Obrázek 3-3: Organizace genomu retrovirů.** Nahoře: DNA provirus. Dole: RNA genom.

Důležitou částí UTR je vazebné místo pro primer (PBS), což je sekvence komplementární k buněčné  $tRNA^{Pro}$ ,  $tRNA^{Lys}$  nebo  $tRNA^{Trp}$ . V 5'UTR se nachází oblast DLS (dimer linkage sequence), která zajišťuje interakce mezi oběma vlákny vedoucí k jejich dimerizaci prostřednictvím vlásenky „kissing loop“. Ve vedoucí sekvenci se nachází balicí signál  $\Psi$ , který umožňuje specifickou vazbu NC regionu prekursoru Gag s genomem a jeho enkapsidaci. Dalším nezbytným funkčním motivem vRNA je PPT (polypurine tract). Tato sekvence se nachází před U3 regionem, je rezistentní vůči aktivitě RNasy H a slouží jako primer při syntéze +DNA řetězce.

Regulační sekvence provirové DNA se nazývají LTR (long terminal repeat) a na rozdíl od UTR jsou obě LTR oblasti totožné, tvořené elementy U3, R a U5. Na začátku U3 a konci U5 elementu se nacházejí att (attachment) sekvence, které obsahují invertované repetice a jsou důležité pro rozpoznání a integraci provirové DNA integrasou. U3 zabírá největší část LTR. Jedná se o druhově velmi různorodý element obsahující vazebná místa pro pozitivní i negativní regulátory transkripce, jako jsou transaktivační faktory, buněčné transkripční faktory a enhancery. V U3 oblasti se nachází promotor řídící transkripci RNA polymerasou II. Elementem R začíná a končí transkripce a tudíž je přítomen na obou koncích transkriptu. Polyadenylační signál AAUAAA se nachází zhruba 20 nukleotidů před koncem transkripce. U5 je sekvence o délce 60-200 nukleotidů obsahující některé cis- a trans-regulační sekvence (Vogt 1997b; Frankel a Young, 1998).

### 3.5 Struktura a funkce retrovirových proteinů

Genom retrovirů bez rozdílu kóduje osm základních proteinů nezbytných pro úspěšný replikační cyklus: matrixový protein (MA), kapsidový protein (CA), nukleokapsidový protein (NC), proteasu (PR), reverzní transkriptasu (RT), integrasu (IN), povrchový glykoprotein (SU) a transmembránový glykoprotein (TM). Retroviry se složitým genomem uplatňují vícenásobný sestřih, což jim dovoluje kódovat doplňkové proteiny, které umožňují interagovat s hostitelským prostředím komplexnějším způsobem, nabízejí pestřejší repertoár prostředků pro manévrování před imunitním systémem a zefektivňují regulaci dějů životního cyklu. Genom HIV-1 kóduje 15 proteinů, ze kterých 12 bylo identifikováno ve virionech. Mezi ostatními proteiny retrovirů jsou proteiny HIV-1 nejlépe prozkoumanými, co se týče struktury a funkce. Popis jednotlivých retrovirových proteinů bude proto v následujících kapitolách ilustrován na HIV-1, pokud nebude řečeno jinak.

Metody používané při určování struktury retrovirových proteinů a útvarů z nich složených zahrnují rentgenovou krystalografii, NMR spektroskopii a kryoelektronovou mikroskopii. Posledně jmenovaná technika je používána především pro získávání informací o nadmolekulárním uspořádání retrovirových obalů. Pomocí rentgenové krystalografie a NMR spektroskopie je možné určit strukturu proteinu na atomární úrovni.

#### 3.5.1 Strukturní proteiny

Polyproteinový prekurzor Gag je během maturace rozštěpen na matrixový protein (MA), kapsidový protein (CA) a nukleokapsidový protein (NC). Mimo těchto tří základních může Gag u některých druhů obsahovat ještě další komponenty. Zkratka Gag je odvozena z antigenních vlastností proteinu a znamená general antigens.

##### Matrixový protein

MA se účastní důležitých procesů zejména během časných a pozdních událostí životního cyklu a díky své afinitě k fosfolipidovým membránám je jedním z klíčových prvků při virové morfogenezi. V kontextu intaktního prekurzoru Gag zajišťuje MA cílení vznikající částice a stabilní asociaci s buněčnou membránou. Vyštěpený MA sehrává úlohu v časně fázi životního cyklu během transportu ribonukleoproteinových komplexů do buněčného jádra.

Doposud byla struktura MA vyřešena pomocí NMR spektroskopie nebo rentgenové krystalografie u devíti zástupců (HIV-1 a -2, SIV, HTLV-2, BLV, M-PMV, RSV, EIAV, a MLV). V roztoku se MA vyskytuje převážně jako monomer, ale v krystalech byl MA pozorován i v trimerní formě. Základem struktury MA je globule tvořená 4  $\alpha$ -helixy, jejichž organizace je mezi jednotlivými zástupci konzervovaná (Conte *et al.*, 1998; Murray *et al.*, 2005). N-konec MA je u valné většiny zástupců kovalentně modifikován myristylací volné aminoskupiny N-koncového glycinu (výjimku v tomto ohledu tvoří např. RSV, EIAV, Visna virus). Dlouhý nepolární řetězec kyseliny myristové se zanořuje do hydrofobní vnitřní vrstvy fosfolipidů a je důležitým, nikoli jediným, mediátorem kontaktu mezi MA a buněčnou membránou. Dalším příspěvkem ke stabilnímu přichycení prekurzoru Gag k buněčné membráně jsou elektrostatické interakce mezi postranními řetězci bazických aminokyselin a polárními hlavami fosfolipidů. Úsek povrchově exponovaných bazických aminokyselin poblíž N-konce MA nese název HBR (highly basic region) a byl identifikován u všech zkoumaných zástupců (Murray *et al.*, 2005). MA se může nacházet ve dvou konformačních stavech vzhledem k orientaci řetězce kyseliny myristové – s myristátem zanořeným uvnitř molekuly [myr(S)] a odhaleným [myr(E)]. Bylo zjištěno, že změna stavu z myr(S) na myr(E), označovaná jako „myristoyl switch“, souvisí se změnou konformace MA při oligomerizaci (Tang *et al.*, 2004). Předpokládá se, že při asociaci molekul prekurzoru Gag dojde v MA vlivem vzájemného přiblížení ke vzniku trimerizačního rozhraní, které stimuluje přechod do konformace myr(E). Naproti tomu v monomerech je upřednostňována konformace myr(S). Snížená afinita vyštěpeného MA k fosfolipidové membráně se po vstupu virové částice do buňky dále zeslabuje vlivem změny povrchového náboje způsobené fosforylací buněčnými kinasami, což vede k disociaci MA. MA byl detekován v ribonukleoproteinových komplexech RTC (reverzně-transkribující komplex) a PIC (pre-integrační komplex), kde hraje roli při jaderném transportu (Bukrinsky *et al.*, 1993; Gallay *et al.*, 1995).

### **Kapsidový protein**

Funkce CA v životním cyklu vyplývá z jeho multimerizačních vlastností. Interakční rozhraní mezi jednotkami CA jsou klíčovým stavebním elementem při tvorbě jak nezralé částice, tak zralého virového core. Vzhledem ke své schopnosti vystavět

multimerní proteinové sítě a k jejich celistvosti má CA zcela zásadní význam pro skládání retrovirových částic.

Trojrozměrná struktura celého CA a/nebo jednotlivých domén byla vyřešena pomocí rentgenové krystalografie a NMR spektroskopie u 9 zástupců napříč retrovirovými rody (HIV-1, RSV, M-PMV, MMTV, EIAV, MLV, HTLV-1, HIV-2, JRSV). CA je tvořen dvěma strukturně separovanými globulárními doménami N-terminální (NTD) a C-terminální (CTD), které přispívají odlišným způsobem ke skládání virových částic. Mutační studie v N-terminální doméně dokládají její význam především pro dozrávání virových částic. Pro mutace v CTD s fatálním vlivem na virovou infektivitu je naopak charakteristické, že jsou příčinou defektů a odchylek již ve stádiu tvorby nezralé částice. V CTD se nachází sekvence 20 aminokyselin zvaná MHR (major homology region), která je při pomnutí reverzní transkriptasy mezi retroviry nejvíce konzervována. U retrovirů neobvyklá vysoká mezidruhová sekvenční identita MHR naznačuje důležitost tohoto regionu, která je doložena množstvím mutačních studií (Frankel a Young, 1998; Freed *et al.*, 1998; Turner a Summers, 1999). Vztah struktury a funkce CA je podrobně probíráán v následujících kapitolách.

### **Nukleokapsidový protein**

Hlavní funkci propůjčuje tomuto malému bazickému proteinu jeho afinita k nukleovým kyselinám. Elektrostatické vlastnosti NC umožňující coulombické interakce s nukleovými kyselinami. Schopnost specificky vázat virový genom jsou kritické pro správné vbalení genomové RNA a tedy i pro vznik infekční virové částice.

Charakteristickým strukturním rysem retrovirových NC je přítomnost jednoho nebo dvou konzervovaných Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>4</sub>-His-X<sub>4</sub>-Cys (CCHC) motivů (Morellet *et al.*, 1992; Summers *et al.*, 1992), které jsou podle chelatovaného atomu nazvány zinkové prsty, a patří do skupiny DNA vazebných motivů. Zinkové prsty se nacházejí v centrální doméně NC a jsou obklopeny úseky bazických aminokyselin. Až na centrální doménu se zinkovými prsty je struktura NC neuspořádaná a velmi flexibilní, což umožňuje přizpůsobit se sterickým požadavkům vazby s nukleovými kyselinami. Specifické a přesné vbalování dimeru genomové RNA do vznikajících částic je výsledkem preferenční vazby NC na signál  $\Psi$  a pozitivní vliv vazby NC na dimerizaci genomu. Po vyštěpení z prekurzoru Gag NC obalí a stabilizuje virový genom při procesu známém jako RNA maturace. NC váže a stabilizuje tRNA primer a



usnadňuje jeho annealing v místě PBS. Dalším příkladem pleiotropní biologické aktivity NC je usnadnění iniciace, transferů řetězce a celkové zvýšení efektivity procesu reverzní transkripce. Nejdůležitější uvedené funkce NC lze shrnout pod pojem RNA chaperon (Frankel a Young, 1998; Freed *et al.*, 1998; Turner a Summers, 1999).

### 3.5.2 Virové enzymy

Otevřený čtecí rámec *pol* kóduje u většiny retrovirů enzymy proteasa (PR), reverzní transkriptasa (RT) a integrasa (IN). Výjimku tvoří rody *Alpharetrovirus* a *Betaretrovirus*, u kterých gen pro PR není součástí čtecího rámce *pol*. U rodu *Betaretrovirus* je PR kódována vlastním čtecím rámcem *pro* a u rodu *Alpharetrovirus* je gen pro PR součástí čtecího rámce *gag*.

#### Proteasa

PR je virový proteolytický enzym, jehož aktivita podmiňuje maturaci virové částice. Ke vzniku infekční virové částice je zapotřebí, aby polyproteinové prekursorů Gag a Gag-Pol byly ve správných pozicích, ve správnou dobu a ve správném pořadí rozštěpeny na jednotlivé funkční domény.

Velmi intenzivní výzkum struktury HIV-1 PR především pomocí rentgenové krystalografie přinesl mnoho dat o uspořádání molekuly a strukturních detailů jejích komplexů s různými inhibitory. Racionální návrh inhibitorů PR se často opírá o tato krystalografická data. HIV-1 PR patří do rodiny aspartátových proteas a je aktivní ve formě symetrického homodimeru. Dimer je stabilizován čtyř-řetězcovým antiparalelním  $\beta$ -skládaným listem, tvořeným  $\beta$ -řetězcí na N- a C-koncích. Aktivní místo se nachází v mezeře mezi oběma podjednotkami a je tvořeno katalytickou triádou Asp-Thr-Gly. V pozici nad aktivním místem se nacházejí "flaps" zahrnující dva antiparalelní  $\beta$ -řetězce. Krystaly HIV-1 PR s inhibitory a NMR studie poukazují na významnou flexibilitu těchto klapek. Tato flexibilita je vyžadována pro enzymovou aktivitu a v komplexech s inhibitory jsou klapky zamknuty v konformaci zakrývající aktivní místo (Frankel a Young, 1998; Freed *et al.*, 1998; Turner a Summers, 1999).

#### Reverzní transkriptasa

Tento pro retroviry charakteristický enzym plní funkci virem kódované polymerasy nesoucí tři enzymové aktivity: RNA-dependentní DNA-polymerasová, DNA-

dependentní DNA-polymerasová a ribonukleasová H. Při replikaci retrovirů musí být virový RNA genom po vstupu do buňky nejdříve převeden na integračně-kompetentní DNA formu. Tento krok zajišťuje RT během procesu reverzní transkripce.

Reverzní transkriptasa HIV-1 je asymetrický heterodimer složený z příbuzných podjednotek p66 a p51. Obě podjednotky sdílí stejný N-koncový úsek tvořený polymerasovou doménou a u podjednotky p66 je na C-konci navíc přítomna další doména - RNAsa H. Polymerasová doména se skládá ze čtyř subdomén: prsty, dlaň, palec a spojení. Subdomény v podjednotce p66 jsou organizovány tak, že vytvářejí velký otvor odhalující katalytická residua Asp110, Asp185 a Asp186. Přestože z pohledu primární sekvence je podjednotka p51 identická, relativní orientace subdomén se dramaticky odlišuje, přičemž prsty jsou „sevřeny“ do dlaně a zakrývají katalytické místo. Podjednotka p51 nemá katalytickou aktivitu, ale vytváří interakce s podjednotkou p66, které jsou důležité pro celkový fold RT (Frankel a Young, 1998; Freed *et al.*, 1998; Turner a Summers, 1999).

### **Integrasa**

Integrasa je enzym odpovědný za začlenění provirové DNA do buněčného genomu. Čtecí rámec kódovaný v integrovaném proviru je posléze transkribován a vzniklý transkript je předlohou pro produkci virového potomstva buněčným proteosyntetickým aparátem.

Struktura všech retrovirových IN je tvořena zhruba 290 aminokyselin dlouhým polypeptidovým řetězcem, který se skládá ze tří domén: N-terminální (NTD), ústřední katalytické (CCD) a C-terminální (CTD). V NTD se nachází motiv vázající zinek, který hraje roli při oligomerizaci. Ačkoli izolované domény tvoří v roztoku dimery, vlastní oligomerní stav IN *in vivo* zatím nebyl s jistotou prokázán. Výsledky mikroskopie atomárních sil (AFM) a elektronové mikroskopie ovšem naznačují, že velikosti komplexů intaktní IN s DNA odpovídají tetramerům. Struktura CCD je topologicky podobná např. katalytické doméně transposase nebo RNase H. Katalytickou funkci zajišťují 3 klíčová residua tvořící motiv D,D(35)E. V CCD se nachází rozsáhlý dimerizační povrch. Hlavní funkcí CTD je vazba DNA. Dimer CTD obsahuje žlábek ve tvaru sedla, ve kterém se nacházejí pozitivně nabitá residua důležitá pro vazbu DNA (Frankel a Young, 1998; Freed *et al.*, 1998; Turner a Summers, 1999). DNA-vazebná doména neobsahuje tolik konzervovaných aminokyselin jako zbylé dvě

domény. Menší stupeň sekvenční homologie vypovídá o rozdílech ve vazebné specifitě u jednotlivých zástupců (Ceccherini-Silberstein et al., 2009).

### **3.5.3 Obalové glykoproteiny**

Obalové glykoproteiny surface (SU) a transmembrane (TM) jsou kódovány čtecím rámcem *env* (envelope). Jejich translace probíhá ze sestřiženého virového transkriptu a díky N-koncovému signálnímu peptidu se odehrává na drsném endoplasmatickém retikulu. Obalové glykoproteiny procházejí buněčnou sekreční drahou, která vede k jejich translokaci na buněčnou membránu. Při průchodu Golgiho komplexem jsou extenzivně glykosylovány. Obalové glykoproteiny jsou syntetizovány jako součást prekurozru Env, který je na rozdíl od strukturního a enzymového prekursoru štěpen buněčnou proteasou, např. furinem.

#### **Povrchový glykoprotein**

SU jako interakční partner virově-specifického buněčného receptoru zajišťuje adhezi na buněčném povrchu a rozpoznání permissivní buňky. SU se nachází na povrchu virové částice, kde je udržován nekovalentními kontakty s TM.

Expozice SU na povrchu virionu jej činí dostupným pro neutralizační protilátky. Zranitelnost vůči imunitnímu systému se promítá do strukturních rysů SU. Konzervované sekvence v místě kontaktu s TM zakrývají variabilní smyčky. Imunologickou identifikaci SU dále znesnadňuje extenzivní heterogenní glykosylace. Z důvodu velké heterogenity ve struktuře a jejím uspořádání se SU zatím nepodařilo vykrytalizovat. Glykoproteinový hrot sestává ze tří podjednotek SU a tří podjednotek TM, přičemž největší příspěvek ke stabilizaci glykoproteinového trimeru pochází z TM (Frankel a Young, 1998; Freed *et al.*, 1998; Turner a Summers, 1999).

#### **Transmembránový glykoprotein**

TM plní hned několik funkcí během časně i pozdní fáze. TM zajišťuje kontakty potřebné pro inkorporaci obalových glykoproteinů do virové částice, udržuje SU na virovém povrchu a jeho fusogenní vlastnosti jsou klíčové pro vstup virové částice do buňky.

Oproti značně variabilnímu SU je struktura TM relativně konzervativní a skládá se z N-terminální ektodomény, transmembránové domény a C-terminálního intravirového segmentu. Interakce C-terminálního segmentu s MA je nezbytná pro

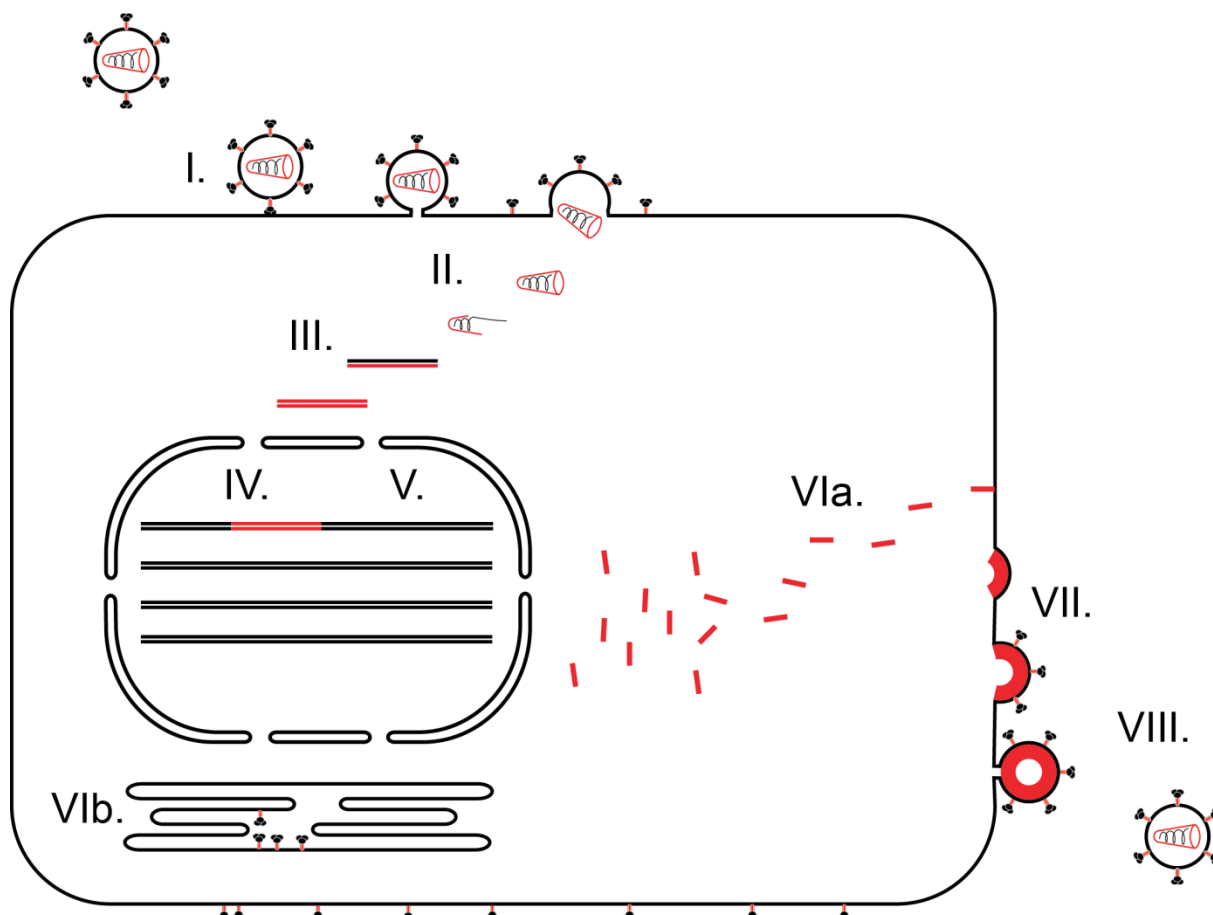
asociaci obalových glykoproteinů s virovou částicí během morfogeneze. Ektodoména je symetrický trimer, tvořený dvojicemi antiparalelních  $\alpha$ -helixů spojených flexibilní smyčkou, dohromady tvořících tzv. coiled-coil strukturu. N-koncové aminokyseliny TM, podobně jako u hemaglutininu viru chřipky, vytvářejí fusogenní peptid. Během interakce SU s receptorem dochází ke konformačním změnám, které jsou propagovány do TM. Série alosterických změn v TM vyvolá odhalení fusogenního peptidu a penetraci buněčné membrány (Frankel a Young, 1998; Freed *et al.*, 1998; Turner a Summers, 1999).

### 3.6 Životní cyklus

Replikační cyklus retrovirů probíhá v několika krocích (Obrázek 3-4), během nichž dochází k perzistentní infekci hostitelské buňky a produkci nových kopií viru. Arbitrárně jej rozdělujeme na dvě fáze, časnou a pozdní. První ze jmenovaných začíná poté, co virová částice ulpí na povrchu permissivní buňky, a zahrnuje všechny události až po chromozomální integraci proviru. Pozdní fáze je odstartována expresí virových proteinů a končí opuštěním infikované buňky virovým potomstvem.

Prvním krokem retrovirové infekce je adheze na buněčný povrch a interakce se specifickým receptorem. Poté následuje vstup virového core do buňky. Po vstupu probíhá několik souběžných dějů, mezi které patří reverzní transkripce vRNA, rozpad virového core a transport virového ribonukleoproteinového komplexu do jádra. Následně je provirová DNA integrována do genomu buňky. Poté nastupuje různě dlouhé období latence (u lentivirů až roky).

Jakmile je transkripčně aktivován provirový lokus, nastává finální fáze replikace retrovirů. Virové proteiny jsou syntetizovány v cytoplasmě a poté jsou transportovány k buněčné membráně. V závislosti na morfologickém typu se prekursor skládá do nezralých částic v cytoplasmě (morf. typ-B/-D) nebo na cytoplasmatické membráně (morf. typ-C, lentiviry). Virová částice následně pučí, čímž získává fosfolipidový obal. Extracelulární částice následně proteolyticky dozrává. Vznikem zralé infekční virové částice se kruh retrovirové replikace uzavírá.



**Obrázek 3-4: Životní cyklus retrovirů.** I – vstup; II – rozpad kapsidy; III – reverzní transkripce; IV – integrace; V – exprese virových genů; VIa – transport polyproteinových prekurzorů; VIb – transport obalových glykoproteinů; VII – skládání nezralé částice/pučení; VIII – proteolytické dozrávání.

### 3.6.1 Vstup do buňky a tropismus

Retroviry jsou schopny pro svůj vstup využít široké spektrum receptorů. Preference ohledně receptorů vyplývá z tropismu – jaká populace buněk jakého organismu je preferována pro replikaci viru. Mezi často využívané receptory patří lipoproteinové receptory – TVA(RSV), receptor pro transferrin Tfr (MMTV), různé transportéry – fosfátový transportér PIT-1 (FeLV), povrchové antigeny lymfocytů – CD4 (HIV-1, HIV-2, SIV) nebo vícenásobné komplexy receptorů (glukosový transporter 1, neuropilin 1, heparan sulfát – HTLV-1) (Ghez *et al.*, 2010; viralzone.expasy.org, 2013).

Pro rozpoznání HIV-1 je klíčovým receptorem CD4 (Sattentau a Weiss, 1988). Tento receptor se nachází na povrchu T<sub>H</sub>-lymfocytů, monocytů, makrofágů a v určité míře také na dendritických buňkách. CD4 je ligandem MHC II komplexu, odpovídá za aktivaci T-lymfocytů a jako takový hraje důležitou úlohu v imunitní odpovědi. Z tohoto důvodu postupná deplece CD4<sup>+</sup> lymfocytů při chronické infekci HIV vede ke

katastrofě buněčné imunity organismu. Pro vstup HIV-1 do buňky je dále vyžadován koreceptor, jehož funkci zastává jeden z chemokinových receptorů: CCR5 a CXCR4. Každý ze známých kmenů HIV-1 využívá buď CCR5 (R5), CXCR4 (X4) nebo oba (R5X4). Prvotní infekce a počínající onemocnění jsou převážně spojeny s tropismem R5. U 40-50% pacientů dochází v pozdějších fázích ke zvratu z R5 na X4, což vede k rapidní progresi onemocnění.

Prvotní adheze virové částice na buněčný povrch je zajišťována interakcemi mezi SU a buněčnými receptory, které v této fázi mohou být i jiné než CD4. CD4 independentní adheze zahrnuje interakce SU s lektiny via povrchové sacharidové složky (Larkin *et al.*, 1989), s receptorem DC-SIGN a dalšími. K přichycení mohou také přispívat interakce vyvolané buněčnými proteiny inkorporovanými do virové membrány jako například ICAM-1, který zvyšuje úspěšnost adheze na buňkách exprimujících jeho ligand LFA-1 (Paquette *et al.*, 1998). Ačkoli v principu připadá v úvahu velký počet způsobů přichycení, kontakt SU s CD4 je z hlediska následujících událostí nejpřímější a nejefektivnější.

Vstup virové částice do buňky provází série konformačních změn zahrnujících molekuly SU, TM, CD4 a koreceptor. Interakce mezi SU a CD4 vyvolá konformační změny v obou jmenovaných molekulách, které vedou k odhalení vazebného místa pro koreceptor na SU. Vazba na koreceptoru vyvolá další změnu konformace v SU, která je propagována do TM. Buněčná fúze obalených virů vykazuje konzervované znaky a také molekulární mechanismus je velmi podobný i u nepříbuzných virů, jako jsou retroviry, virus chřipky či Ebola. TM odhalí fusogenní peptid, který se zanoří do buněčné membrány. Odhalení hydrofobního povrchu trimeru TM vede k reorganizaci tří  $\alpha$ -helikálních úseků, které jsou „ohnuty“ do antiparalelní „coiled-coil“ struktury a spolu vytvářejí svazek šesti helixů. Kooperace několika těchto  $\alpha$ -helikálních svazků má za výsledek přiblížení membrán a jejich následnou fúzi (Chan *et al.*, 1997).

### **3.6.2 Role virové kapsidy a jejího rozpadu během časných událostí**

V časně fázi retrovirové infekce jsou v cytoplasmě buněk detekovatelné ribonukleoproteinové komplexy, které jsou na základě svého složení rozlišovány na reverzně transkribující komplexy (RTC) a pre-integrační komplexy (PIC). RTC obsahují RNA nebo RNA-DNA intermediáty reverzní transkripce, zatímco PIC jsou

z definice integračně-kompetentní komplexu a jako takové obsahují provirovou DNA, IN a případně další faktory účastnící se integrace.

Rozpad virového core časově ohraničují následující události: vstup obsahu virové částice do cytoplasmy a jaderný import PIC. Přesné časové a místní určení procesu rozpadu core dosud nebylo jednoznačně prokázáno. Vědecký konsenzus ohledně rozpadu core se na základě současných a nedávných experimentálních výsledků přiklání k variantě rozpadu závislého na dokončení reverzní transkripce a přiblížení core k jádru. Od starého modelu, ve kterém core sloužilo k dopravě virového genomu do cytoplasmy a poté se okamžitě rozpadlo, se postupně upouští. Core slouží po vstupu do cytoplasmy jako schránka chránící virový genom a s ním asociované enzymy, dohromady tvořící RTC, před intervencí buněčné imunity. Dále se podílí na udržení relativně vysoké koncentrace RT vůči vRNA, což je nezbytné pro efektivní reverzní transkripci. Mutace destabilizující core mají negativní dopad na produkci provirové DNA, výsledkem čehož je snížena infektivita. Podobný dopad na infektivitu mají i hyperstabilní mutanty. Ukazuje se tedy, že optimální stabilita virového core je jeho klíčovým atributem. Pokud je v cytoplasmatických kapsidách inhibována RT, nedochází k jejich rozpadu, ale k akumulaci v okolí jaderné membrány. Přestože virové core je po vstupu do cytoplasmy jednoznačně destabilizováno, nabízí se tedy varianta, že se rozpadá až na základě vnitřního signálu a jedná se o řízený proces nikoli o průběžnou ztrátu jeho pláště (Arhel, 2010).

### **3.6.3 Reverzní transkripce**

Reverzní transkripce je komplikovaný enzymatický proces přepisu genomové ssRNA do provirové dsDNA prováděný RT. Za hlavní spouštěč je považována změna okolního prostředí po vstupu do buňky, zajišťující dostatečný přísun nukleosid trifosfátů.

Reverzní transkripce startuje od místa nasednutí tRNA primeru (PBS) syntézou DNA komplementární k U5 a R regionům. Templátová RNA pro tyto regiony je následně degradována RNAsou H. Nově vzniklý úsek DNA je přenesen na komplementární sekvenci na 3' konci genomové RNA (1. transfer řetězce), odkud je syntetizován (-) řetězec DNA až po PBS. RNAsa H poté v DNA/RNA hybridu degraduje všechnu RNA s výjimkou úseku zvaného polypurinový trakt (PPT), který

odolává degradaci a slouží jako primer pro syntézu (+) řetězce. Zvláštností genomu HIV-1 je přítomnost 2 PPT sekvencí, a s tím spojená syntéza (+) řetězce ze dvou startů, která má za následek vznik krátkého trojřetězového překryvu v centrální oblasti (v angl. DNA flap). Veškerá zbývající RNA je poté degradována RNAsou H. (+) řetězec DNA je poté přenesen do místa komplementárního k PBS v (-) řetězci (2. transfer řetězce) a je dokončena jeho syntéza. Vzniklá dvojřetězcová DNA je kompetentní k integraci do genomu hostitele (Coffin *et al.*, 1997).

### 3.6.4 Cytoplasmatický a jaderný transport

Cytoplasma při svém vysokém obsahu proteinů, organel, částí cytoskeletu atd. tvoří velmi viskózní prostředí. V takovém prostředí prostá difuze není efektivním způsobem překonávání vzdálenosti pro předmět velikosti virové kapsidy. Retroviry tento problém obcházejí napojením na buněčný transportní systém využívající cytoskelet. Aktinová mikrofilamenta slouží retrovirům pro počáteční přiblížení z periferních regionů do dosahu mikrotubulů, pomocí kterých překonávají delší vzdálenost až do perinukleární oblasti. Mezi virové proteiny umožňující komunikaci s buněčným cytoskeletem patří faktor Nef, který interaguje s faktorem PAK2, který se pomocí dalšího buněčného faktoru, cofilinu, podílí na remodelaci aktinové sítě (Stolp *et al.*, 2009). HFV a HIV-1 využívají buněčné motory dynein-dynactin asociované s mikrotubuly pro transport RTC/PIC k MTOC (McDonald *et al.*, 2002; Petit *et al.*, 2003). Jakým způsobem se retroviry dostávají od MTOC k jádru není jasné.

U většiny retrovirů může infekce proběhnout pouze v mitotických buňkách. Naproti tomu HIV-1 a ostatní lentiviry se mohou replikovat i v nedělících se buňkách a úspěšnost jejich infekce nezávisí na buněčném cyklu. Aby mohla proběhnout integrace do interfázního chromatinu, PIC HIV-1 musí být aktivně transportován přes jadernou membránu. Pro využití jaderného importu při tomto kroku hovoří odhalení několika redundantních jaderných lokalizačních signálů (NLS) v sekvenci IN,MA,Vpr a „DNA přesahu“ v centrální oblasti proviru. IN a provirový cis-aktivní element jsou pro svoji vysokou karyofilní povahu považovány za nejdůležitější (Yamashita, 2005). Nicméně přesná úloha jednotlivých signálů stejně tak jako detaily importu zatím čekají na objasnění.



### 3.6.5 Integrace

Provirová DNA je spolu s IN a dalšími součástmi komplexu PIC, transportována do karyoplasmy, aby zde došlo k její integraci. Tento proces zprostředkovává virová IN a je podpořen několika buněčnými faktory.

IN specificky váže koncové repetitivní motivy provirové DNA označované jako att (attachment). Poté jsou endonukleasovou aktivitou IN 3'konce DNA zkráceny o dva nukleotidy. Upravené 3' konce jsou transesterifikační reakcí napojeny na řetězců hostitelské DNA v cílovém místě. Doplnění chybějících nukleotidů v místech napojení a ligace řetězců je provedena buněčnými opravnými mechanismy.

IN přímo interaguje s buněčným proteinem LEDGF, který je nezbytným kofaktorem integrace. LEDGF je transkripčním koaktivátorem, je vyžadován pro připoutání IN k chromatinu a asistuje při integraci. IN také interaguje s proteinem HMG-1, komponentami chromatinového remodelačního komplexu SWI/SNF a dalšími buněčnými faktory, které se mohou podílet na výběru místa, úpravě chromatinu nebo zvyšovat účinnost integrace (Delelis *et al.*, 2008).

### 3.6.6 Transkripční regulace a latence

Provirus HIV-1 se integruje převážně do transkripčně aktivních míst genomu a disponuje velmi silným promotorem, optimalizovaným pro buněčný transkripční aparát. Navzdory tomu dochází u lentivirů v čele s HIV-1 po integraci k ustavení dlouho trvajícího období latence, během kterého je provirus deaktivován. Příčinu tohoto paradoxního fenoménu je třeba hledat ve virových a buněčných transkripčně-regulačních mechanismech, epigenetických faktorech a v určité míře také v metabolickém stavu a jeho dynamice v rámci infikovaných buněk.

K integraci proviru HIV-1 dochází preferenčně v intronech aktivně transkribovaných genů. Epigenetické umlčování proviru umožňují vysoce uspořádané nukleozomy, které jsou po integraci sestaveny v okolí promotoru. LTR oblasti váží buněčné faktory, které přitahují histon deacetylasy a histon methyltransferasy, následkem čehož dochází ke kondenzaci chromatinu v okolí promotoru, represi transkripce a latenci.

Transkripce HIV je regulována jak na úrovni iniciace, tak elongace. V 5'LTR se nachází množství cis-aktivních elementů. Promotor obsahuje tři vazebná místa pro transkripční faktor SP1, která fungují jako esenciální upstream aktivátor. Roli

enhanceru plní tandemové vazebné místo pro transkripční aktivátor NF- $\kappa$ B upstream od promotoru. Vazba heterodimeru NF- $\kappa$ B rekrutuje histon acetyltransferasy a další chromatin remodelační enzymy, které odblokují promotor a umožní transkripčním faktorům zahájit transkripci (Mbonye a Karn, 2011).

Elongace transkripce je regulována zpětnovazebním mechanismem, jehož klíčovým hráčem je virový faktor Tat. Tat funguje jako autoregulátor virové transkripce a jeho hladina determinuje, zda nastane exprese viru nebo latence. Tat se váže na svůj regulační element TAR (trans-activation responsive element) lokalizovaný za iniciačním kodonem. V nepřítomnosti faktoru Tat je RNA polymerasa II krátce po startu transkripce pozastavena (stalled). Pokud je faktor Tat k dispozici, naváže se na TAR a přitahuje elongační faktor P-TEFb. P-TEFb je cyklin-dependetní kinasa, která fosforyluje RNA polymerasu II, čímž vzroste její procesivita a efektivita elongace se rapidně zvýší. Pokud je stimulována bazální míra transkripce, dostupnost faktoru Tat způsobí masivní indukci exprese viru. Zpětnovazebný okruh Tat dává promotoru bipolární charakter a poskytuje odezvu „všechno nebo nic“ (Karn, 2011).

Většina T-lymfocytů v organismu se v daném okamžiku nachází v klidovém  $G_0$  stavu. Provirus HIV-1 se může v infikovaných CD4<sup>+</sup> T-lymfocytech integrovat pouze tehdy, pokud jsou tyto buňky aktivovány. Část efektorových T-buněk ale prochází reverzí zpět do klidového stadia a stávají se z nich paměťové T-lymfocyty. Jelikož metabolická aktivita těchto buněk vzhledem k jaderné dislokaci transkripčních aktivátorů NF- $\kappa$ B a P-ETFb neumožňuje expresi viru, stávají se rezervoárem perzistentní infekce HIV-1 (Marcello 2006).

### **3.6.7 Translace virového proteomu a její regulace**

Retrovirová RNA má některé vlastnosti společné s mRNA, jako je čepička a polyA signál, avšak jiné se z důvodu její multifunkčnosti zásadně odlišují. vRNA slouží na rozdíl od mRNA jako předloha pro více polypeptidových řetězců. Buněčné mRNA obsahují na 5' konci krátký UTR s relativně prostou strukturou, který umožňuje ribozomální skenování počátku translace. Naproti tomu vRNA je v místě 5' UTR vzhledem k přítomnosti mnoha cis-aktivních a regulačních sekvencí vysoce strukturovaná. Účinná translace polycistronního retrovirového genomu vyžaduje

specializované mechanismy, které jsou výsledkem vzájemného působení buněčných faktorů, retrovirových proteinů a vRNA.

Prekurzor Gag může hrát v translaci roli jak pozitivního, tak negativního regulátoru. Při nízkých cytoplasmatických koncentracích polyproteinu Gag se zvyšuje účinnost translace virového transkriptu. Při vysokých koncentracích dochází k jeho enkapsidaci na úkor translace (Anderson a Lever, 2006).

5' konec vRNA mnoha retrovirových zástupců (M-PMV, HFV, HTLV-1, HIV-1) obsahuje PCE (post-transcriptional control element). Do místa PCE se váže buněčná RNA helikasa A, která usnadňuje asociaci polyribosomů a zajišťuje robustní translaci těchto transkriptů (Hartman *et al.*, 2006).

Nesestřižená RNA je špatným substrátem pro jaderný export. Tento problém je u některých zástupců eliminován přítomností cis-aktivních RNA elementů a jejich interakčních partnerů, jakými jsou HIV-1 Rev responsive element (RRE) a Rev, HTLV-1 Rex responsive element (RxRE) a Rex, či M-PMV constitutive transport element (CTE). Zatímco HIV-1 a HTLV-1 kódují vlastní faktory pro jaderný export (Rev, Rex), v případě geneticky jednoduššího M-PMV se CTE váže přímo na jaderný exportní receptor Tap/NXF1 (Ernst *et al.*, 1997; Jin *et al.*, 2003).

Sestřižená RNA komplexních retrovirů jako jsou HIV-1 a HTLV-1 často obsahuje více iniciačních kodonů AUG s méně účinnými Kozakovými sekvencemi, které umožňují iniciaci translace z alternativního místa a balancování poměru virových proteinů, jako je tomu v případě HIV-1 Vpr/Env.

Syntéza retrovirových polyproteinů v konkrétním poměru je velmi důležitá v podstatě pro všechny události životního cyklu a translační regulace relativního zastoupení polyproteinových prekurzorů Gag, Gag-Pol (a u betaretrovirů také Gag-Pro-Pol) proto není devizou pouze komplexních zástupců, ale retrovirů jako takových. Na konci čtecího rámce *gag* se nachází tzv. kluzká sekvence, což je repetitivní sekvence se stabilní sekundární strukturou, která umožňuje změnit čtecí rámec a translatovat prekurzor Gag-Pol (resp. Gag-Pro). K přeskoku čtecího rámce dochází obecně v pravidelných intervalech, což přesně a stabilně reguluje vzájemný poměr virových prekurzorů. Poměr Gag-Pol: Gag v případě HIV-1 odpovídá 1:20. Betaretroviry mají další kluzkou sekvenci ve čtecím rámci *pol*, která umožňuje translaci prekurzoru Gag-Pro-Pol. Jiným způsobem translační regulace konstatního poměru prekurzorů je pročení stopkodonu čtecího rámce *gag* (Coffin *et al.*, 1997). U

MLV byla prokázána interakce RT s buněčným terminačním faktorem eRF1, což má za následek občasné pročtení stopkodonu a pokračování v translaci prekurzoru Gag-Pol (Orlova *et al.*, 2003).

### 3.6.8 Morfogeneze virových částic

Morfogeneze virových částic je komplexní proces, který zahrnuje množství dílčích procesů, mezi které patří transport nasyntetizovaných virových prekurzorů, jejich polymerace a asociace s cytoplasmatickou membránou, enkapsidace RNA, procesy vedoucí k vychlípení buněčné membrány a následně tvorbě extracelulární virové částice. Tato sekce shrnuje poznatky o retrovirové morfogenezi z pohledu buněčných faktorů a aparátů, které se přímo nebo nepřímo účastní vzniku virových částic a jejich opouštění buňky. Protein-proteinovým interakcím mezi virovými složkami, které zajišťují existenci zralých i nezralých částic, a jejich transformaci v průběhu maturace se, vzhledem k jejich významnosti pro tuto diplomovou práci, podrobně věnuje celá následující kapitola.

Nově syntetizované virové prekurzory jsou transportovány do místa skládání nezralých částic, které se v případě zástupců morfologického typu-C nachází na plasmatické membráně (PM) a v případě typu-B/-D v cytoplasmě. Zásadní otázka zní: jakým způsobem a jestli vůbec je v tomto procesu angažován buněčný cytoskeletární transport. Prekurzor Gag M-PMV obsahuje ve své sekvenci signál CTR (cytoplasmic targeting-retention), který jej cílí pomocí dynein/dynactinového komplexu do pericentriolárního regionu, kde se skládají nezralé částice M-PMV (Sfakianos *et al.*, 2003). Mutace v regionu CTR přesměrují skládání nezralých částic M-PMV na virovou membránu, jako je tomu v případě morfologického typu-C (Rhee a Hunter, 1990). Bylo zjištěno, že prekurzor Gag různých retrovirových druhů (MLV, M-PMV, HIV-1, SIV) interaguje s buněčným motorem z rodiny kinesinů KIF-4 (Tang *et al.*, 1999), který zprostředkovává aktivní transport směrem od jádra k buněčným periferiím, a ztráta funkce tohoto proteinu inhibuje produkci VLP (viru-podobných částic) HIV-1 (Martinez *et al.*, 2008). Navzdory tomu byla pozorována tvorba VLP HIV-1 v buňkách s rozrušenou mikrotubulovou sítí (Jouvenet *et al.*, 2006). Plausibilní model popisující úlohu cytoskeletu a asociovaných proteinů při dopravě a skládání virových částic zatím čeká na objevení.

Již bylo zmíněno, že pučení virové částice je vázáno na lipidové rafty. Tyto membránové formace mimo jiné obsahují fosfolipid PI(4,5)P<sub>2</sub>, který při skládání virové částice a především při cílení tohoto procesu hraje zcela prominentní roli. PI(4,5)P<sub>2</sub> obsahuje jeden nasycený, jeden nenasycený řetězec mastné kyseliny a fosfoinositolovou hlavici připojené popořadě v pozicích 1', 2' a 3' k molekule glycerolu. Interakce PI(4,5)P<sub>2</sub> s MA je specifická a komplexní. Kyselá fosfoinositolová hlavice interaguje s bazickými aminokyselinami HBR na povrchu MA. 2' řetězec nenasycené mastné kyseliny se váže do hydrofobického žlábků uvnitř struktury MA a jeho vazba je exklusivní vzhledem k N-koncovému myristátu (Saad *et al.*, 2006). Vazba na PI(4,5)P<sub>2</sub> tudíž vyvolá odhalení myristátu a jeho zanoření do membrány. Bylo zjištěno, že PI(4,5)P<sub>2</sub> je nezbytný pro produkci virových částic HIV-1, MLV a M-PMV a jeho deplece v plasmatické membráně vede k lokalizaci prekursoru Gag do odlišných buněčných kompartmentů (Ono *et al.*, 2004; Stansell *et al.*, 2007; Hamard-Peron *et al.*, 2010).

Takzvané pozdní domény tvoří krátký sekvenční motiv, který je nezbytný pro pučení virových částic a v určité podobě byl identifikován u všech obalených virů (Morita *et al.*, 2004). Jsou známy tři třídy pozdních domén: P(T/S)AP, YP(X)<sub>n</sub>L a PpxY. V prekursoru Gag může být přítomna i více než jedna taková doména (HIV-1 – PTAP, YPLTSL; M-PMV – PTAP, PPPY) a mohou spolu kooperovat nebo se vzájemně nahrazovat. Hlavní role pozdních domén spočívá v rekrutaci faktorů buněčných ESCRT komplexů: PTAPinteraguje s TSG101, YP(X)<sub>n</sub>L s AIP1 a PPxY váže WW doménu faktoru Nedd4.

Multiproteinové komplexy ESCRT se řadí do několika tříd (ESCRT-0, -I, -II, -III) a mezi jejich celulární funkce patří formace multivesikulárních tělísek (MVB), třídění proteinů pro lokalizaci do MVB a také zaškrcení membrány při cytokinezi. Pučení HIV-1 závisí na činnosti komplexů ESCRT-I a ESCRT-III. První ze jmenovaných napomáhá prohnout membránu při vzniku pupenu a je zapojen pomocí vazby pozdní domény jeho součástí TSG101. Komplex ESCRT-III slouží k odškrcení pupenu od plasmatické membrány a s prekurzorem Gag je provázán přes vzájemné interakce s AIP1 faktorem.

Pučení retrovirů bylo často spojováno s endosomy a MVB, vzhledem k využívání společné dráhy ESCRT a časté intracelulární lokalizaci virových částic právě v endosomech. Tyto indicie vedly k teorii, že membrány těchto organel mohou

sloužit pro skládání a pučení virových částic a že jejich exocytosa může být alternativní cestou opuštění buňky. Platnost této teorie byla ovšem vyvrácena a bylo prokázáno, že skládání virových částic HIV-1 probíhá na cytoplasmatické membráně a jejich lokalizace v endosomech je způsobena endocytosou vypučených částic (Jouvenet *et al.*, 2006).

### **3.7 Skládání a zrání virových částic**

Virová částice se v průběhu životního cyklu nachází ve dvou charakteristických morfologických stavech – zralém a nezralém. Rozdíly ve stavbě a skládání zralé a nezralé částice reflektují odlišné nároky kladené na jejich vlastnosti v průběhu rozmnožování. Nezralá částice je tvořena přibližně 2500 jednotkami prekursoru Gag (Carlson *et al.*, 2008). Z tohoto počtu je po rozštěpení polyproteinového prekursoru Gag použito pouze asi 1500 jednotek CA pro stavbu zralého virového core (Ganser *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000; Briggs *et al.*, 2003; Pornillos *et al.*, 2011). Vzhledem k tomu, že zralá i nezralá síť mají podobné hexamerní uspořádání a kontakty mezi nimi zajišťují stejné proteinové domény, nabízí se představa, že zralé core vzniká proteolytickým uvolněním preformované sítě CA od virové membrány a její kondenzací ve středu virové částice. Takový předpoklad je však v rozporu s nálezy rozpustné frakce CA a vícevrstevných či mnohočetných core ve zralých virionech (Briggs *et al.*, 2003; Benjamin *et al.*, 2005). Sousední hexamery se v nezralé částici nacházejí v kompaktnějším uspořádání a vzdálenost jejich středů činí 8 nm na rozdíl od 10 nm ve zralé částici (Nermut *et al.*, 1998; Mayo *et al.*, 2003; Ganser-Pornillos *et al.*, 2007; Wright *et al.*, 2007), což není konzistentní s konceptem zhuštění již existující sítě. Skládání zralé částice je *de novo* proces a jeho zahájení vyžaduje prvotní destabilizaci nezralé sítě (Benjamin *et al.*, 2005; Briggs *et al.*, 2006; Wright *et al.*, 2007; Purdy *et al.*, 2009; Monroe *et al.*, 2010). Rozhraní udržující integritu hexamerní sítě ve zralé a nezralé částici jsou navíc zajišťována téměř výlučně odlišnými interakcemi (Bharat *et al.*, 2012).

#### **3.7.1 *In vitro* skládání**

Retrovirové kapsidy jsou inherentně nestabilní útvary. Zkoumání intaktních retrovirových kapsid s sebou přináší mnohé nesnáze, protože se ukázalo jako výhodné použití *in vitro* přístupů. Tyto modelové systémy umožnily prozkoumat

různé, dříve experimentálně nedostupné aspekty skládání i rozpadu zralých a nezralých částic, jakými je jejich organizace a kvartérní struktura. VLP složené *in vitro* věrně reprodukuje strukturní poměry v autentických částicích, což dokazují biochemické (von Schwedler *et al.*, 1998; von Schwedler *et al.*, 2003; Rumlová-Kliková *et al.*, 2000; Ulbrich *et al.*, 2006) i strukturní analýzy (Briggs *et al.*, 2003; Ganser-Pornillos *et al.*, 2004; Purdy *et al.*, 2008). S přibývajícími znalostmi o skládání virových částic se rozšiřují i možnosti využití *in vitro* systémů a nově našly uplatnění například při screeningu inhibitorů skládání virů. Při interpretaci výsledků *in vitro* studií je však třeba mít na paměti, že každý modelový systém, byť sebelepší, je stále vázán na podstatně odlišné podmínky než skládání virových částic *in vivo*, a že je nutné je doplnit o relevantní biologická data.

Bylo zjištěno, že pro modelové systémy skládání je možné využít různě dlouhé části prekurzoru Gag. Kliková *et al.* (1995) objevila a popsala *in vitro* skládání bakteriálně exprimovaného prekurzoru Gag M-PMV v celé délce. Následovaly podobné systémy pro RSV (Campbell a Vogt, 1997) a HIV-1 (Gross *et al.*, 2000), které popisovaly skládání bakteriálně exprimovaného purifikovaného prekurzoru Gag. Nejmenší část prekurzoru Gag, která se skládá *in vitro*, je v případě HIV-1 (Ehrlich *et al.*, 1992) a M-MuLV (Mayo *et al.*, 2003) CA. Podmínky pro *in vitro* skládání CA se pro další retroviry nepodařilo nalézt. Nejmenší assembly-kompetentní část prekurzoru Gag pro většinu retrovirů je CANC. Systémy pro skládání fúzního proteinu CANC byly vyvinuty pro lentiviry – HIV-1 (Campbell a Vogt, 1995; Gross *et al.*, 1997), alpharetroviry – RSV (Campbell a Vogt, 1995), betaretroviry – M-PMV (Rumlová-Kliková *et al.*, 2000) a také gammaretroviry – XMRV (Hadravová *et al.*, 2012).

Skládání fúzního proteinu CANC může být provedeno ve dvou módech. Bylo zjištěno, že u retrovirů konzervovaný prolin na N-konci CA podmiňuje tvorbu N-terminální  $\beta$ -smyčky. Rozdílné podoby N-konce CANC mohou sloužit pro simulaci strukturních změn probíhajících ve virové částici při maturaci. CANC obsahující N-koncový Pro1 svým strukturním uspořádáním mimikuje skládání maturní virové částice, zatímco konstrukty, ve kterých je tento prolin deletován ( $\Delta$ ProCANC), mutován či zablokován prodloužením N-konce, napodobují skládání nezralých částic (Gross *et al.*, 1998; von Schwedler *et al.*, 1998; Rumlová-Kliková *et al.*, 2000; Ulbrich *et al.*, 2006).

### 3.7.2 Prekurzor Gag: organizátor skládání virové částice

Nezralá částice je tvořena zhruba sférickou vrstvou polyproteinových prekurzorů, obalenou virovou membránou. Terciární a kvartérní uspořádání této částice je zakódováno ve struktuře prekurzoru Gag. Exprese samostatného prekurzoru Gag vede ke tvorbě VLP bez nutnosti účasti dalších virových proteinů (Gheysen *et al.*, 1989). Nicméně pro tvorbu infekční virové částice je zapotřebí také buněčných faktorů, genomové RNA a fosfolipidové obálky, přičemž prekurzor Gag je spojujícím článkem mezi nimi.

HIV-1 Gag se skládá z několika funkčních modulů (MA, CA CTD, CA NTD, SP1 a NC), které spolupracují na utváření nezralé částice. Monomerní Gag se v roztoku nachází v přehnuté konformaci, kdy doména MA je v kontaktu s C-terminální doménou NC (Datta *et al.*, 2007a), což znemožňuje navázání na membránu. Jakmile dojde k multimerizaci, prekurzor Gag zaujímá prodlouženou konformaci, která favorizuje odhalení myristátu a vazbu membrány. Synergistické působení oligomerizace prekurzoru Gag a jeho vazby k membráně vede ke spřažení a vzájemné regulaci těchto procesů (Ono *et al.*, 2000; Dalton *et al.*, 2005; Datta *et al.*, 2007b).

Vrstva tvořená MA doménami není v nezralé částici organizována do pravidelné multimerní sítě (Wright *et al.*, 2007; Briggs *et al.*, 2009; de Marco *et al.*, 2010). MA je navíc postradatelný pro formaci VLP (Reil *et al.*, 1998; Gross *et al.*, 2000). Účast MA na intermolekulárních kontaktech mezi jednotkami prekurzoru Gag tudíž není podstatná pro formaci nezralé částice.

Domény CA NTD, CA CTD a také SP1, což je krátký úsek, který spojuje CA s NC, navazují nejdůležitější laterální kontakty mezi jednotkami prekurzoru Gag v nezralé částici HIV-1 (Ganser-Pornillos *et al.*, 2008; Briggs a Kräusslich, 2011). Důležitost funkčních povrchů CA, zejména regionů v okolí helixů 1-3, 4-6, MHR a helixu 9, dokládají biochemické mutační studie (von Schwedler *et al.*, 2003), experimenty s vodíkovo-deuteriovou výměnou (Monroe *et al.*, 2010) a trojrozměrné struktury různě dlouhých částí prekurzoru Gag a jeho multimerních útvarů.

Příspěvek nespecifických interakcí RNA s NC ke skládání virové částice spočívá ve vzájemném přiblížení molekul prekurzoru Gag (Burniston *et al.*, 1999), čímž se zvýší jeho efektivní koncentrace v místě skládání (Campbell a Vogt, 1997; Gross *et al.*, 2000), nicméně pro samotnou formaci multimerů prekurzoru Gag nejsou



tyto interakce důležité. Doména NC je pro skládání prekursoru Gag postradatelná, pokud je nahrazena samoasociační doménou jako např. leucinovým zipem (Zhang a Barklis, 1997; Crist *et al.*, 2009).

### 3.7.3 Architektura nezralé částice

Náhled do ultrastruktury nezralé částice v poměrně vysokých detailech umožnilo použití kryo-elektronové tomografie. Informace o nezralé částici, které jsou rekonstruované pomocí této techniky, lze zařadit do dvou kategorií: lokální a globální. Lokální informace obsahuje detailní mapu elektronové hustoty, poskytuje podklad pro umístění trojrozměrných modelů jednotlivých domén do míst, kde se nacházejí v strukturním prekursoru, a tím umožňuje mapovat důležité kontakty mezi samotnými doménami. Kryo-elektronový tomogram v globální podobě poskytuje jiný druh informace, a sice o souhrnné organizaci nezralé sítě, a co je důležité, o vrstvách tvořených jednotlivými doménami prekursoru Gag.

Analýza globálního uspořádání nezralé částice HIV-1 ukázala, že hexamerní síť prekursoru Gag je propojená a kontinuální, nicméně obsahuje velké „díry“. Síť v nezralé částici nemá žádný globální prvek symetrie a o její zaoblení se starají heterogenní defekty různorodých geometrií, nikoliv pentamery (Wright *et al.*, 2007; Briggs *et al.*, 2009; Marco *et al.*, 2010). Poměrně rozsáhlá část membrány není zevnitř pokryta jednotkami prekursoru Gag. Největší mezeru v nezralé síti představující přibližně 1/3 plochy zaujímá místo, odkud došlo k vypuštění a odštěpení membrány (Carlson *et al.*, 2010).

Lokální informace odhaluje vzájemné orientace jednotlivých domén a opakující se oligomerní motivy v jednotlivých vrstvách polyproteinové sítě v nezralé částici HIV-1. Ve vrstvách nejbližší k membráně a středu virionu, které odpovídají MA a NC, nejsou pozorovatelné žádné prvky symetrického oligomerního uspořádání. Ostatní vrstvy jsou uspořádány s vysokou pravidelností do multimerních sítí. Vrstva CA NTD je tvořena hexamerními prstenci s velkými centrálními otvory. Vrstva CA CTD obsahuje dvou- a tříčetné prvky symetrie odpovídající vrcholům a stěnám hexamerů. Pod středem hexamerních útvarů ve vrstvách CA NTD a CA CTD, vystupují směrem do středu virionu podlouhlé útvary tvořené CA/SP1 spojnící, které zřejmě zaujímají helikální konformaci a dohromady vytvářejí šestičetný  $\alpha$ -helikální svazek (Wright *et al.*, 2007; Briggs *et al.*, 2009), což odlišuje nezralou síť prekursoru Gag HIV-1 od M-

PMV, ve které tento  $\alpha$ -helikální svazek nebyl pozorován (de Marco *et al.*, 2010; Bharat *et al.*, 2012). Tyto informace jsou ve shodě s výsledky biochemických studií, podle kterých úsek na rozhraní domén CA a SP1 přispívá ke stabilizaci hexamerů prekursoru Gag HIV-1 a je taktéž nezbytný pro formaci jeho nezralé sítě (Kräuslich *et al.*, 1995; Accola *et al.*, 1998).

Struktura nezralé částice M-PMV s rozlišením 8 Å (Bharat *et al.*, 2012) přinesla zatím nejpodrobnější informaci o interakčních rozhraních a orientaci domén prekursoru Gag v nezralé částici. Podle těchto strukturních údajů CA NTD nevytváří žádné intra-hexamerní kontakty a nezralý hexamer je tvořen pouze pomocí kontaktů mezi doménami CA CTD. Toto hexamerizační rozhraní v CA CTD zahrnuje residua v helixu 11 a MHR. CA CTD přispívá k vytvoření jak intra-, tak inter-hexamerních kontaktů (Wright *et al.*, 2007; Bharat *et al.*, 2012). Důležitou vlastností CA CTD je tvorba homodimerních interakcí zprostředkovaných residuy v helixu 9. Schopnost CA CTD vytvářet dimerizační rozhraní byla pozorovaná také v roztoku CA a krystalech CA (Gamble *et al.*, 1997; Woehlake *et al.*, 1999; Ivanov *et al.*, 2007). Propojení hexamerů je zajištěno nejen pomocí uvedeného CA CTD dimerizačního rozhraní, ale také CA NTD kontaktů. CA NTD vytváří homodimer pomocí interakce mezi residuy v helixech 4, 5, 6 a 7. CA NTD dimer je propojen s přilehlými dimery pomocí N-konce helixu 4, který vytváří menší trimerizační rozhraní (Bharat *et al.*, 2012).

### 3.7.4 Maturace

Během maturace dochází k transformaci nezralé částice ve zralou a infekční formu. Virová proteasa rozštěpí prekursor Gag za vzniku zralé kapsidy, tvořené CA, obalující NC/RNA komplex. Proteasa je vyštěpena z polyproteinového prekursoru autokatalytickým mechanismem. Proteasa je aktivní ve formě dimeru, tudíž je vyloučeno její štěpení v monomerním prekursoru Gag. Kdy a jak přesně je proteasa aktivována, zatím není zcela známo. Úspěšný vznik zralé částice vyžaduje, aby štěpení prekursorů proběhlo v definovaných místech v přesném pořadí (Tritch *et al.*, 1991; Wiegers *et al.*, 1998). Proteolytické reakce v prekursoru HIV-1 Gag po sobě následují v tomto pořadí: 1) SP1-NC, 2) MA-CA, SP2-p6 3) NC-SP2 4) CA-SP1 (Wiegers *et al.*, 1998). Posloupnost štěpných reakcí je regulována odlišnými reakčními rychlostmi pro jednotlivá štěpná místa (Pettit *et al.*, 1994).

Nejdříve je odštěpena část obsahující NC, což uvolní virový genom z vazby na prekurzor Gag. Přibližně ve stejnou dobu probíhá štěpení MA-CA a SP2-p6, což vede k separaci funkčních domén prekurzoru Gag a kondenzaci komplexu RNA s NC. Posledním krokem, který destabilizuje nezralou síť a zahájí skládání zralé kapsidy, je štěpení v pozici CA-SP1 (Wiegiers *et al.*, 1998). Jaký je význam štěpení v pozici NC-SP2 dosud není známo (Coren *et al.*, 2007).

Skládání zralého core je umožněno vyštěpením CA z prekurzoru a post-proteolytickými změnami v terciární struktuře CA, zejména refoldováním N-konce. Pozoruhodné je, že strukturní změny na N-konci jsou odstartovány až po oddělení C-konce CA od SP1 (Monroe *et al.*, 2010). Na uvolněném N-konci dojde k reorganizaci původně nestrukturovaných koncových residuí do konformace  $\beta$ -smyčky jak u HIV-1 (Gitti *et al.*, 1996), tak u M-PMV (Macek *et al.*, 2009). Tato  $\beta$ -smyčka je charakteristickým rysem maturního CA a její formace je nezbytným předpokladem pro vytvoření zralé částice (Gross *et al.*, 1998; von Schwedler *et al.*, 1998; Rumlova-Klikova *et al.*, 2000; Wildová *et al.*, 2008). Stabilizaci N-terminální  $\beta$ -smyčky zajišťuje interakce mezi retroviry konzervovaných aminokyselin – Pro1 a Asp lokalizovaným ve 3. helixu CA (Gitti *et al.*, 1996; Kingston *et al.*, 2000; Mortuza *et al.*, 2008; Macek *et al.*, 2009).  $\beta$ -smyčka k formaci zralé sítě přímými interakcemi nepřispívá, její role spočívá v destabilizaci nezralé sítě a reorientaci klíčových domén CA, jež zajišťují interakce ve zralé částici (Gross *et al.*, 1998; von Schwedler *et al.*, 1998; Kelly *et al.*, 2006; Pornillos *et al.*, 2010).

### 3.7.5 Zralá částice

Zralé virové core je útvar s fulerenovou geometrií tvořený sítí CA obalující RNP komplex genomové RNA, NC a virových enzymů. Planární hexamerní síť CA je deformována do uzavřeného prostorového útvaru inkorporací přesně 12 pentamerů, jejichž distribuce v rámci kapsidy rozhoduje o jejím tvaru. Kónického tvaru kapsidy lentivirů (HIV-1) je dosaženo asymetrickým polárním rozložením pentamerů v poměru 5:7, válcovitý tvar u betaretrovirů (M-PMV) zajišťuje symetrické polární rozložení a pseudosférického nebo polyedráního tvaru u ostatních retrovirů (RSV, MLV) je docíleno rovnoměrným rozmístěním pentamerů (Vogt 1997).

Klíčovým parametrem retrovirové kapsidy je její optimální stabilita. Příliš časný nebo naopak příliš pozdní rozpad by zamezil úspěšné infekci hostitele. Interakce,

které drží virové core pohromadě, jsou evolučně optimalizovány tak, aby byla zajištěna rovnováha mezi stabilitou a regulovaným rozpadem zralé kapsidy v pravý okamžik (Forshey *et al.*, 2002; Mateu 2009).

Ve zralých částicích se nezřídka nalézají velmi polymorfní útvary, jako např. mnohonásobné, polyvrstevnaté či nedokončené kapsidy (Briggs *et al.*, 2003; Briggs *et al.*, 2006; Butan *et al.*, 2008). Skládání virového core tedy zřejmě neprobíhá jednotným mechanismem.

Vnitřní organizace zralých virionů HIV-1 je patrná z kryo-elektronových tomogramů. Ribonukleoproteinový komplex je podle mapy elektronové hustoty lokalizován uvnitř širšího konce kapsidy. Užší konec kapsidy jak HIV-1 (Benjamin *et al.*, 2005; Briggs *et al.*, 2006), tak RSV (Butan *et al.*, 2008) se nachází v přímém kontaktu s MA vrstvou podél membrány a to v místech, kde přes membránu proniká trimer TM, což naznačuje, že tato místa slouží jako iniciační místa (Ganser-Pornillos *et al.*, 2008).

### **Kvarternární motivy ve zralé částici**

Hexamery tvořící zralou síť jsou z hlediska obou domén CA organizovány odlišným způsobem než hexamery tvořící nezralou síť prekursoru Gag a tato změna je zapříčiněna přestavbou intermolekulárních kontaktů v průběhu maturace (Bharat *et al.*, 2012). Funkce jednotlivých domén CA jsou ve zralé částici přesně opačné než v nezralé částici. Hexamery a pentamery CA jsou tvořeny prstenci CA NTD, jejichž vzájemné propojení je zprostředkováno kontakty mezi dimerizačními doménami CA CTD sousedících prstenců.

Hexamer CA je složen ze dvou symetrických prstenců CA NTD a CA CTD. Celkovým tvarem připomíná obrácený šálek. Poloměr hexameru se rozšiřuje směrem od NTD k CTD. Každá molekula CA přispívá třemi helixy v NTD k sestavení centrálního svazku 18 helixů, který vytváří core hexameru (Ganser-Pornillos *et al.*, 2007). Struktura pentameru CA je uspořádána analogicky. Core pentameru tvoří centrální svazek 15 helixů CA NTD a okraj pentameru je tvořen širším prstencem CA CTD. Mezi interakčními rozhraními v hexameru a pentameru není zásadní rozdíl, pouze dochází k jejich vzájemnému pootočení, které je kompenzováno jemným přeskupením sítě vodíkových můstků (Pornillos *et al.*, 2011).

### **Interakční povrchy v maturním CA**

Hexamerní síť zralého CA je stabilizována třemi druhy interakčních rozhraní: NTD-NTD, CTD-CTD, NTD-CTD.

Helixy 1, 2 a 3 NTD se podílejí na skladbě centrálního svazku osmnácti helixů v hexameru CA (Mortuza *et al.*, 2004; Ganser-Pornillos *et al.*, 2007; Pornillos *et al.*, 2009). Kontrapozice helixu 2 vůči helixům 1 a 3 z jiné podjednotky vytváří interakční rozhraní NTD-NTD a je hlavním kohezním prvkem centrálních osmnácti helixů. Důležitou část interakčního povrchu tvoří hydrofobní interakce zprostředkovaná postranními řetězci M39 a A42, jejichž mutace narušuje skládání a potlačuje infektivitu (von Schwedler *et al.*, 2003; Ganser-Pornillos *et al.*, 2004). Další kontakty mezi interagujícími helixy jsou nejčastěji polární interakce. Většina postranních řetězců však neinteraguje přímo, ale jejich kontakt je přemostěn molekulami vody, což vytváří rozsáhlou a flexibilní síť vodíkových můstků. Jednoduchá reorganizace této plastické sítě umožňuje akomodovat lehce modifikovaná rozhraní v pentameru (Pornillos *et al.*, 2009).

Propojení hexamerů resp. pentamerů zajišťují CA CTD dimery. HIV-1 CA je v roztoku přítomen ve formě dimeru (Gamble *et al.*, 1997; von Schwedler *et al.*, 1998; Byeon *et al.*, 2009). HIV-1 CA dimer se může nacházet ve dvou formách: s paralelní konfigurací (Gamble *et al.*, Berthet-Colominas *et al.*, 1999; Worthylake *et al.*, 1999; Ternois *et al.*, 2005) a s prohozenými doménami (Ivanov *et al.*, 2007). Konformaci CTD dimeru ve zralé síti se podle mapy elektronové hustoty ve zralé částici nejvíce blíží struktura vyřešená Worthylakem *et al.* (1999). Interakce v dimeru s paralelní konfigurací zajišťují symetrické paralelní kontakty mezi helixy 9 a hydrofobní interakce mezi 3<sub>10</sub> helixem a helixem 9 různých podjednotek (Gamble *et al.*, 1997; Worthylake *et al.*, 1999; Byeon *et al.*, 2009).

Obě domény CA jsou propojeny interakcemi mezi helixem 8 v CTD a helixy 3, 4 a 7 v NTD. Většinu interakčního povrchu tvoří jako v případě NTD-NTD rozhraní polární interakce, ačkoli pro skládání a infektivitu je důležitý také hydrofobní kontakt mezi postranními řetězci Y169 a L211 (Bartoňová *et al.*, 2008). Na kontaktech obou domén se ve větším počtu podílejí i některé poměrně nezvyklé interakce označované jako helix „s čepičkou“. Při této interakci je v kontaktu podstava helixu jedné molekuly

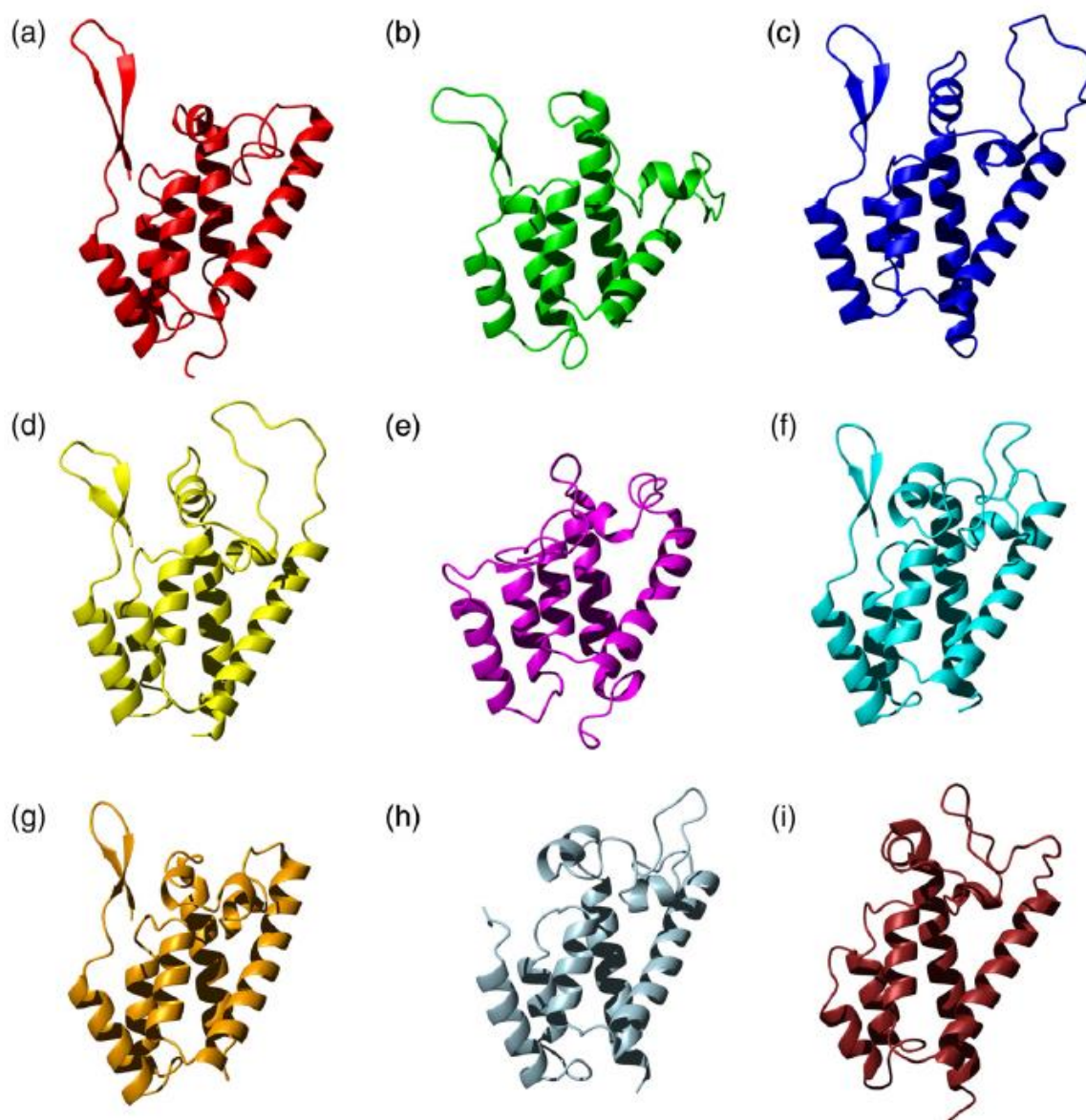
s postranním řetězcem z jiné molekuly. Podle toho modelu vytváří R173 C-čepičku helixu 3, D166 N-čepičku helixu 4, E71 N-čepičku helixu 11, Q219 C-čepičku helixu 7 a R143 C-čepičku helixu 8. Všechny tyto interakce s výjimkou poslední jmenované jsou intermolekulární (Bailey *et al.*, 2012).

### 3.8 Terciární struktura CA NTD M-PMV a dalších retrovirů

Strukturní uspořádání N-terminální domény kapsidového proteinu je mezi retroviry významně konzervováno, a to i přes nízkou sekvenční homologii těchto proteinů. Celkový helikální fold je u všech CA NTD velmi podobný (Obrázek 3-5). Určité změny se odehrávají v oblasti vazebné smyčky pro cyklofilin a v N-koncové  $\beta$ -smyčce.

Trojrozměrná struktura CA NTD M-PMV tvarem připomíná hlavici šípů a je tvořena šesti  $\alpha$ -helixy a  $\beta$ -smyčkou na N-konci. CA NTD některých retrovirů (HIV-1, RSV) se skládá ze sedmi  $\alpha$ -helixů, neboť úsek propojující helix 4 a C-terminální helix obsahuje buď pouze helix 5 (M-PMV) anebo dva dílčí helixy 5 a 6 (HIV-1, RSV). V tomto úseku se v případě HIV-1 CA NTD nachází také flexibilní smyčka, která váže buněčný protein cyklofilin A. Délka a konformace této smyčky se mezi jednotlivými retroviry podstatně liší.

N-terminální  $\beta$ -smyčka M-PMV CA NTD je stabilizována solným můstkem mezi Pro1 a Asp57 (Macek *et al.*, 2009). Podobná interakce mezi vysoce konzervovaným N-koncovým prolinem a aspartátem v helixu 3 byla identifikována i v dalších retrovirech: HIV-1 (Gitti *et al.*, 1996), B-MLV (Mortuza *et al.*, 2008), RSV (Kingston *et al.*, 2000), HTLV (Cornilescu *et al.*, 2001) a JRSV (Mortuza *et al.*, 2009). Mutace narušující solný můstek neumožnily u M-PMV (Wildová *et al.*, 2008) a HIV-1 (von Schwedler *et al.*, 1998) formaci  $\beta$ -smyčky. Naproti tomu u HTLV-1 sice došlo ke strukturním změnám v okolí  $\beta$ -smyčky, nicméně její tvorba byla zachována (Bouamr *et al.*, 2005). V mutantech M-PMV CA NTD narušujících tvorbu  $\beta$ -smyčky byly největší strukturní změny pozorovány nejen u N-koncových residuí a helixu 3, ale také u helixu 5, což naznačuje určitý podíl na interakci či dokonce stabilizaci  $\beta$ -smyčky jejími kontakty s tímto helixem (Macek *et al.*, 2009).



**Obrázek 3-5: Struktura CANTD různých retrovirových druhů.** a) NMR struktura M-PMV; b) krystalová struktura B-MLV; c) NMR struktura HIV-1; d) krystalová struktura HIV-1; e) NMR struktura HTLV-1; f) krystalová struktura RSV; g) krystalová struktura JRSV; h) NMR struktura RSV; i) krystalová struktura EIAV. Převzato z Macek *et al.* (2009).

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Chemikálie

Agar	HiMedia
Agarosa	Bio-Rad, USA
Akrylamid	Sigma-Aldrich, USA
Ampicilin	Sigma-Aldrich, USA
APS (peroxodisíran amonný)	Sigma-Aldrich, USA
Bromfenolová modř	Sigma-Aldrich, USA
D-glukosa ( $^{13}\text{C}$ )	Cambridge Isotope Laboratories, USA
$^2\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich, USA
DOC (deoxycholát sodný)	Fluka, Germany
DMSO (dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, USA
dNTP (deoxyribonukleotid trifosfát) mix	Promega, USA
DTT (dithiothreitol)	Roth GmbH, Germany
EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina)	Sigma-Aldrich, USA
GelRed Nucleic Acid Stain	Biotium, USA
Glycerol	Sigma-Aldrich, USA
Glycin	Sigma-Aldrich, USA
Chlorid amonný ( $^{15}\text{N}$ )	Cambridge Isotope Laboratories, USA
IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid)	Sigma-Aldrich, USA
Molekulové standardy	– 1kb DNA Ladder – NEB, USA – 100 bp DNA Ladder - NEB, USA – Protein Test Mixture 4+5, Serva
N, N' methylenbisakrylamid	Sigma-Aldrich, USA
Protein cocktail inhibitor	Sigma-Aldrich, USA
SDS (dodecylsulfát sodný)	Fluka, Germany
TCEP-HCl (tris(2-carboxyethyl)fosfin hydrochlorid)	Gold Biotechnology, USA
TEMED (N,N,N',N' tetramethylendiamin)	Roth GmbH
Thiamin	Calbiochem, USA
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, USA
Ostatní chemikálie	Fluka, Lachema, Sigma a Penta



### 4.1.2 Enzymy a proteiny

BSA	New England Biolabs
Lysozym z vaječných bílků	Fluka, Switzerland
<i>Phusion</i> DNA polymerasa (2 U/μl)	Finnzymes
Restrikční endonukleasy	New England Biolabs
RNAsa A	Roche
T4 DNA ligasa	Invitrogen

### 4.1.3 Komerční kity

QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
Zyppy Plasmid miniprep kit	Exbio

### 4.1.4 Buňky, plasmidy a oligonukleotidy

#### Bakteriální kmeny *E coli*

DH5α  
BL21 Star (DE3)

#### Plasmidy

pUC19	Novagen
pET22b	Novagen

#### Oligonukleotidy

5' A-Xba                      5'-CAA TTC CCC TCT AGA AAT AAT-3'  
3' M-PMV CANTD 1-140    5'-TTT TTT CTC GAG CAT GGC CAG GCC TTG-3'

## 4.1.5 Roztoky a média

### Roztoky pro přípravu a kultivaci buněk *E. coli*

LB médium                      25 g Luria-Bertani média  
doplnit vodou do 1 l

LB agar                         25 g Luria-Bertani média  
25 g LB agar  
doplnit vodou do 1 l

10x M9 soli                    0,5 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
0,25 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
85 mM NaCl

M9 minimální médium      1x M9 soli  
25 mM  $\text{MgSO}_4$   
15 mM thiamin  
20mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$   
0,2%(w/v) D-glukosa  
pH 7,4

M9 minimální médium, izotopově značené ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ )  
1x M9 soli  
25mM  $\text{MgSO}_4$   
15mM thiamin  
20 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $^{15}\text{N}$ )  
0,2% (w/v) D-glukosa ( $^{13}\text{C}$ )  
pH 7,4

### Roztoky pro agarosovou elektroforézu

TBE pufr                      34mM Tris-HCl  
44mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$   
1 mM EDTA  
pH 8

DNA vzorkový pufr 6x      0,25% (w/v) bromfenolová modř  
0,25% (w/v) xylenová modř  
40% (w/v) sacharosa

**Pufry pro manipulaci s proteiny**

Pufr A      50 mM Tris.HCl  
150 mM NaCl  
1 mM EDTA  
1 mM TCEP.HCl  
pH 8

Vzorkový pufr pro NMR spektroskopii

50 mM Tris.HCl  
150 mM NaCl  
1 mM EDTA  
1 mM TCEP.HCl  
5% deuterium oxid  
pH 8

**Roztoky pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu**

Tris-glycinový pufr      25 mM Tris.HCl  
250 mM glycin  
0,1% (w/v) SDS

Proteinový vzorkový pufr 2x

50 mM Tris.HCl  
100 mM merkaptoethanol  
2% (w/v) SDS  
0,1% (w/v) bromfenolová modř  
10% (v/v) glycerol  
pH 6,8

#### Proteinový vzorkový pufr 6x

150 mM Tris.HCl  
300 mM merkaptoethanol  
6% (w/v) SDS  
0,3% (w/v) bromfenolová modř  
30% (v/v) glycerol  
pH 6,8

#### Coomassie blue barvicí roztok

0,5 g Coomassie Brilliant Blue G-250  
90 ml methanol  
20 ml kyselina octová  
90 ml voda

#### Odbarvovací roztok

10% (v/v) kyselina octová  
40% (v/v) methanol

#### Sušící roztok

25% (v/v) ethanol  
3% (v/v) glycerol

### 4.1.6 Přístrojové vybavení

Analytické váhy

AdventurerPro, Ohaus

Centrifugy

Allegra X-15R, Beckman Coulter

Avanti J-30I, Beckman Coulter

Centrifuge 5424, Eppendorf

Sorvall Evolution, Kendro

Fotoaparát

Quantum-ST4 1100-20LM XPRESS,  
Vilber Lourmat

Horizontální agarosová elektroforéza

Horizon 58, Bio-Rad

Inkubátor

CULTURA Mini-incubator, Merck

Jímač frakcí

Fraction Collector Frac-950, GE  
Healthcare

NMR spektrometr	Bruker Avance III 600 MHz s TCI kryosondou
PCR termocykler	TC-3000, Techne
Předvážky	S1002, BEL
Rotační inkubátor	Innova 44, New Brunswick Scientific
Termostat	Thermomix BM-P, B. Braun Biotech International
Transiluminátor	2UV, UVP USA
Ultrazvukový homogenizátor	Sonoplus GM 2200, Bandelin Electronic
UV-VIS spektrofotometr	ND-1000, Nanodrop Biophotometer plus, Eppendorf
Vertikální elektroforéza	Mini-PROTEAN 3, Bio-Rad
Zařízení pro FPLC	ÄKTApurifier 10 (P-903), GE Healthcare
Zdroj napětí	PowerPac Junior, Bio-Rad

## 4.2 Metody

### 4.2.1 DNA metody

#### Polymerasová řetězová reakce

Polymerasové reakce byly provedeny pomocí Phusion polymerasy od firmy Finnzymes dle instrukcí v protokolu od výrobce. Reakční směsi byly namíchány podle níže uvedeného seznamu. Program pro provedení polymerasové reakce v termocykléru obsahoval následující kroky:

Krok	Teplota; čas
1) Počáteční denaturace	98°C; 1min
2) Denaturace	98°C; 10 s
3) Nasedání primeru	$T_m - 5^\circ\text{C}$ ; 30 s
4) Extenze templátu	72°C; 1 min/ 1 kb
5) Finální extenze nedokončených řetězců	72°C; 5 min

Cyklus 2-4 byl 15x opakován. Bylo-li třeba optimalizovat specifitu primerů či výtěžek, byla teplota nasedání primerů nejprve nastavena na  $T_m - 2^\circ\text{C}$  a v průběhu programu byla 2x snížena o  $3-5^\circ\text{C}$ .

Složení reakční směsi:

	Koncentrace	Objem
Templátová DNA	1 µg/µl	1 µl
Primery	20 pmol/µl	2x1,3 µl
Phusion pufr	5x	10 µl
Phusion polymerasa	3U/µl	1 µl
Směs dNTP	2,5 mM	3 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0 – 10 µl

Množství  $\text{Mg}^{2+}$  bylo optimalizováno pro konkrétní reakci. Směs byla doplněna HPLC H<sub>2</sub>O na 50 µl.

#### Agarosová elektroforéza

Pro analýzu velikosti DNA fragmentů byla použita horizontální elektroforéza v 0,7-1% agarosovém gelu s přidavkem fluorescenčního činidla GelRed. Vzorky byly smíchány s příslušným množstvím DNA vzorkového pufru a nanесeny do jamek v agarosovém

gelu. Elektroforéza byla provedena při konstantním napětí 120 V po 30 min v TAE pufru. Horizontální pozice DNA fragmentů byla vizualizovaná pomocí UV transluminátoru a jejich velikost byla odhadnuta z porovnání se standardem.

### **Izolace DNA z gelu**

Po excizi DNA fragmentů z gelu byly tyto izolovány pomocí kitu QIAquick Gel extraction kit (QIAGEN) dle protokolu od výrobce.

### **Štěpení restrikčními endonukleasami**

Restrikční štěpení DNA bylo provedeno enzymy od firmy New England Biolabs dle podmínek uvedených výrobcem. Restrikční směs byla inkubována při teplotě dané pro konkrétní enzym 1 h pro 1 enzym a 2 h pro směs dvou restrikčních enzymů.

### **Ligace DNA fragmentů**

Nejprve bylo provedeno restrikční štěpení klonovaného úseku DNA a zvoleného vektoru. Poté byly fragmenty separovány v agarosovém gelu a izolovány. Po purifikaci příslušných fragmentů byla provedena ligace s použitím T4 DNA ligasy od firmy Invitrogen. Ligační směs byl inkubována při teplotě 16°C nebo na směsi led-voda přes noc. Množství fragmentů přidaných do ligační směsi bylo voleno podle koncentrace (vizuální indikace podle intenzit zón na agarosové elektroforéze) a velikosti fragmentů. Výsledným produktem byly transformovány kompetentní buňky *E. coli* DH5α. Jako marker pro selekci pozitivních kolonií byl použit ampicilin.

### **Transformace kompetentních buněk *E coli***

Kompetentní buňky (DH5α nebo BL21 STAR (DE3)) zmrazené na -80°C byly inkubovány 30 min v nádobě s ledem. Po přidání 1 µg DNA ke 100 µl suspenze buněk byla směs inkubována na ledu dalších 30 min. Buňky byly poté podrobeny teplotnímu šoku při teplotě 42°C po dobu 1,5 min. Následně bylo přidáno 900 µl LB média vytemperovaného na 37°C a směs byla inkubována 1 h při 37°C. Po transformaci byly buňky rozetřeny na vytemperovanou Petriho misku s LB agarem obsahující selekční marker (ampicilin) a inkubovány přes noc při 37°C.

### **Izolace plasmidové DNA**

Pro amplifikaci plasmidové DNA byly buňky *E coli* DH5α transformovány podle návodu uvedeného v sekci Transformace kompetentních buněk *E. coli*. Pro mini-, midi- a maxi- preparaci DNA byly transformované kolonie zaočkovány v uvedeném

pořadí do 3, 50 a 100 ml LB média obsahujícího selekční marker (ampicilin). Buňky byly inkubovány přes noc při 37°C a 220 RPM v rotační třepačce a následně sklizeny centrifugací při 2000-4000 g po 10 min. Preparace DNA byla provedena pomocí kitů od společnosti Zyppy nebo QIAGEN podle instrukcí od výrobce.

### **Restrikční analýza**

Správnost klonovaných úseků byla ověřena pomocí restrikční analýzy specificky navržené pro daný konstrukt. Restrikční štěpení bylo provedeno podle postupu v oddílu Štěpení restrikčními endonukleasami. Positivní výsledek byl verifikován pomocí sekvenace.

## **4.2.2 Manipulace s proteiny**

### **SDS-PAGE**

Separace proteinů byla vzhledem k velikosti proteinu klíčového pro tuto práci (15,5 kDa) prováděna pomocí vertikální elektroforézy v 18% polyakrylamidovém (PAA) gelu. Proteinové vzorky byly povařeny s PLB obsahujícím SDS 15 min, nanесeny do jamek gelu, zaostřeny v 5% PAA gelu při napětí 100 V a rozděleny při napětí 200 V. Rozdělené proteiny byly detekovány barvením Coomassie brilliant blue 250.

### **Exprese rekombinantních proteinů v buňkách *E. coli***

Buňky *E. coli* BI21 STAR (DE3) byly transformovány podle návodu uvedeného v oddíle DNA metody, sekce Transformace kompetentních buněk *E. coli*. Jako médium bylo použito buď LB médium anebo, v případě přípravy izotopově značeného vzorku, M9 minimální médium obsahující jako jediný zdroj uhlíku  $^{13}\text{C}$ -glukosu a jako zdroj dusíku  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ . Do 400 ml média byly zaočkovány transformované buňky ze 2-3 Petriho misek tak, aby počáteční  $\text{OD}_{600}$  bylo 0,1. Buňky byly inkubovány v rotační třepačce při 37°C a 220 RPM, dokud OD nedosáhlo 0,7 - 0,9, a poté byla indukována exprese přidavkem IPTG do výsledné koncentrace 0,4 mM. Buňky byly inkubovány při stejných podmínkách 4 h a následně sklizeny centrifugací při 6000 g po 15 min. Buněčná peleta byla zamražena na -20°C.



### **Dezintegrace buněk**

Buněčná peleta byla resuspendována v 5 ml pufru A. K resuspendátu bylo přidáno 5 mg lysozymu a směs byla míchána 30 min při 4°C. Poté byly buňky dezintegrovány ultrazvukem v 6 cyklech po 10 s při výkonu 35 W za stálého chlazení v nádobě s ledem. Po přidavku sodné soli deoxycholové kyseliny do výsledné koncentrace 0,1% byla směs míchána 30 min při 4°C. Nerozpustné zbytky buněčných struktur byly odstraněny centrifugací při 20000 g po 10 min. Supernatant S<sub>1</sub> obsahující N-terminální doménu kapsidového proteinu byl skladován při -20°C.

### **Gelová chromatografie**

Vzorek byl purifikován pomocí středotlaké (FPLC) gelové permeační chromatografie. Dělení probíhalo v pufru A na koloně HiLoad 16/60 s náplní Superdex 75 pg. Na kolonu byl nanesen supernatant S<sub>1</sub> pomocí 5 ml nástřikové smyčky. Separát byl jímán ve frakcích po 6 ml. Frakce po chromatografii byly analyzovány pomocí SDS PAGE. Frakce obsahující žádaný protein byly spojeny a zahuštěny na požadovanou koncentraci.

### **Stanovení koncentrace proteinů**

Koncentrace proteinů byla stanovena metodou dle Bradfordové. K 20 µl vzorku proteinu bylo přidáno 200 µl reagentu Bradfordové. Směs byla inkubována 5 min při laboratorní teplotě a poté byla změřena absorbance při 590 nm. Koncentrace vzorku byla určena pomocí kalibrační křivky.

### **Příprava vzorku pro NMR spektroskopii**

Protein v pufru A byl zahušťován centrifugační ultrafiltrací při 2000 g v kyvetách o velikosti pórů 10 kDa (Amicon Ultra, Milipore) na koncentraci 1-2 mM. Součástí vzorkového pufru bylo redukční činidlo TCEP o koncentraci 1mM. K roztoku proteinu bylo přidáno množství D<sub>2</sub>O tak, aby výsledné koncentrace D<sub>2</sub>O byla 10%.

Pro měření pH závislosti byl 1 ml proteinu o koncentraci přibližně 0,5 mM převeden do dialyzační membrány se sepačním limitem (MWCO) 5 kDa. Vzorek byl dialyzován přes noc při teplotě 4°C proti 0,5 l pufru A o požadovaném pH.

### **Lyofilizace proteinu**

Roztok proteinu o koncentraci zhruba 1 mg/ml byl zamražen na -80°C, vložen do lyofilizační baňky a ponechán v lyofilizačním zařízení přes noc.

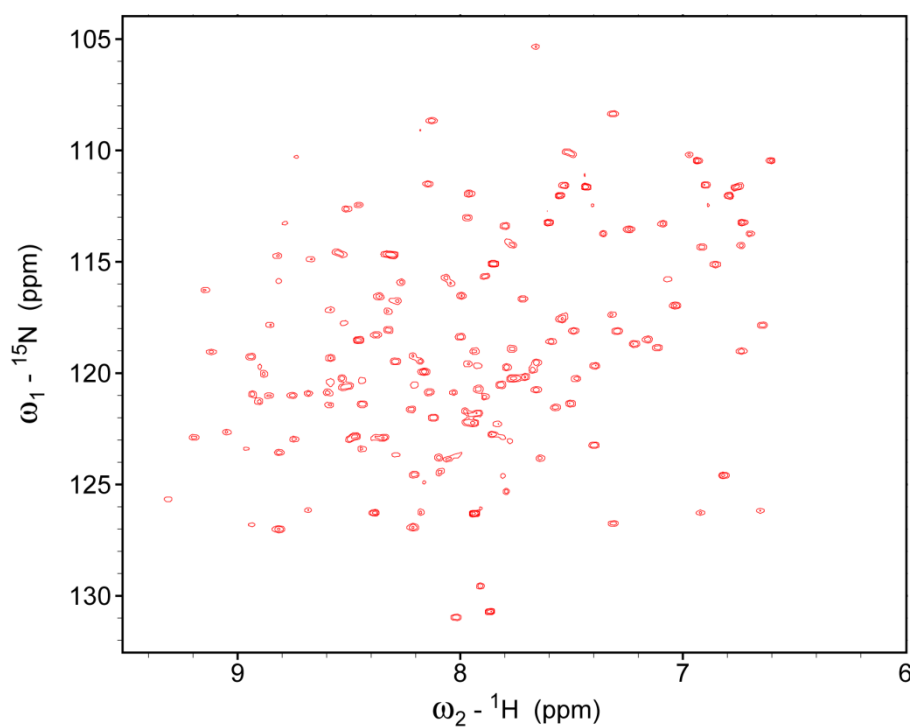
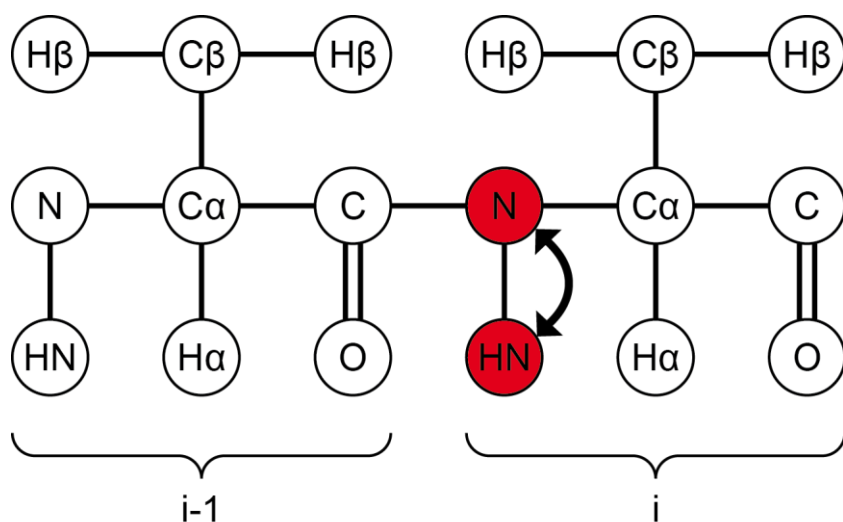
### 4.2.3 NMR spektroskopie

Akvizice NMR spekter probíhala s využitím spektrometru Bruker Avance III 600 MHz s TCI  $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  kryosondou při teplotě 25 °C, pokud není uvedeno jinak. Naměřená spektra byla zpracována v programu TopSpin 3.1. Analýza spekter byla provedena v programu CcpNmr Analysis (Vranken *et al.*, 2005).

#### Přiřazení resonancí

Pro identifikaci a interpretaci signálu v NMR spektrech je nutné jednoznačně určit chemické posuny jednotlivých atomů proteinu. Krospíky jsou oblasti s lokálním maximem intenzity signálu ve vícedimenzionálním spektru. Souřadnice krosníků ve spektru vypovídají o rezonanční frekvenci jader měřených v daném experimentu, tedy o jejich chemickém posunu za daných podmínek. Analýzou vhodné kombinace vícedimenzionálních spekter je možné přiřadit resonance skupinám atomů a tím pádem určit chemické posuny jednotlivých jader.

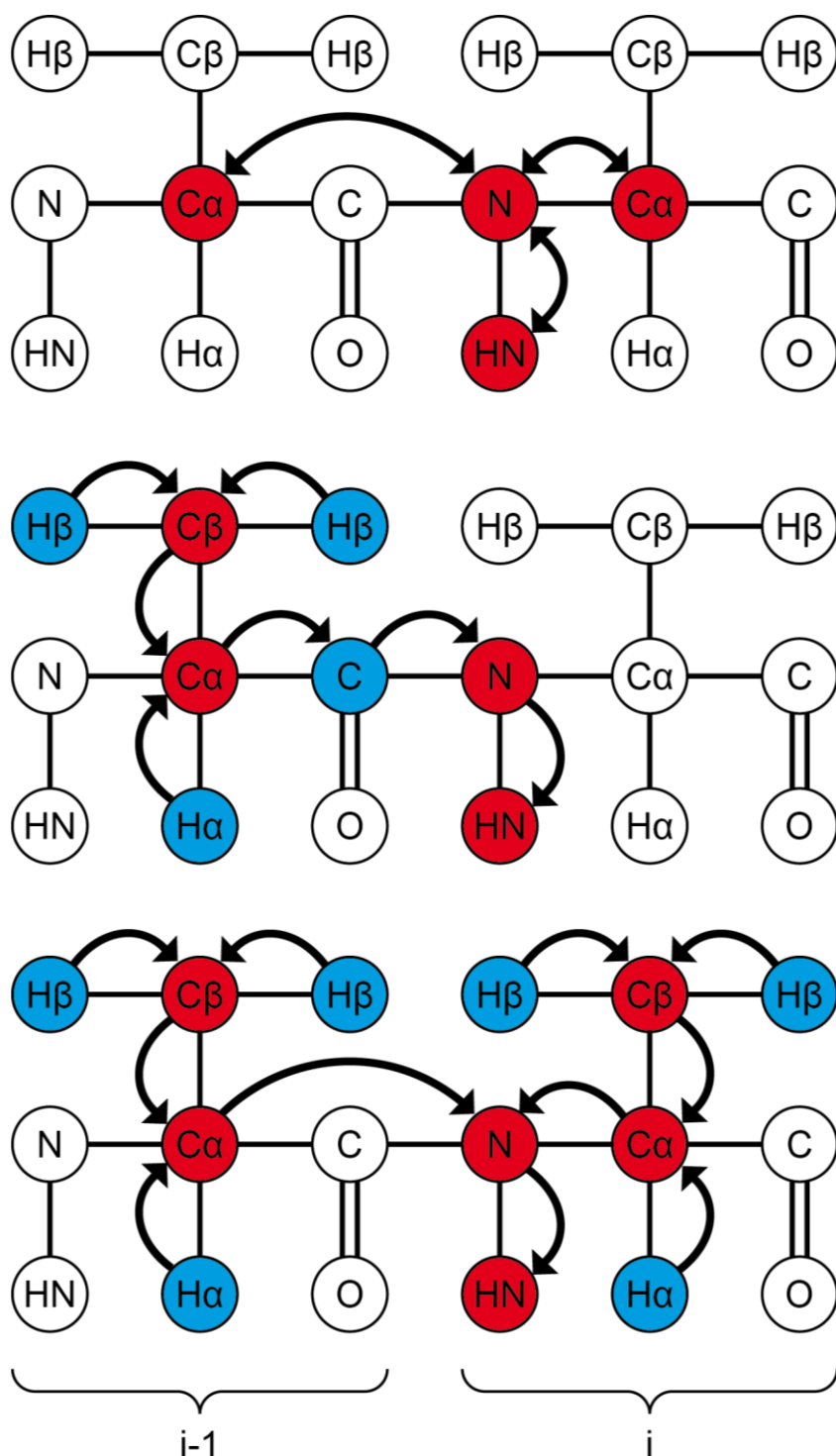
Základní informaci o proteinu poskytuje 2D experiment  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC (Obrázek 4-1), který koreluje chemický posun  $^1\text{H}$  s chemickým posunem  $^{15}\text{N}$  v rámci amidové skupiny. Tento experiment je velmi citlivým ukazatelem změny prostorového uspořádání polypeptidového řetězce, neboť jakékoli změny chemického okolí amidové skupiny se promítnou do chemických posunů příslušných jader.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC experiment je vhodný nástroj pro posouzení kvality a kondice vzorku z hlediska správného sbalení, degradace, apod. Toto spektrum slouží i pro základní posouzení vlivu dané mutace na změnu struktury proteinu, srovnáme-li je se spektrem divokého typu.



**Obrázek 4-1:  $^1H$ - $^{15}N$  HSQC experiment a spektrum.** Nahoře:  $^1H$ - $^{15}N$  HSQC experiment koreluje jádra  $^1H^N$  s jádry  $^{15}N$ . Dole: Rozptyl resonancí v HN spektru vypovídá o správném sbalení proteinu. Pozice resonancí ve spektru je unikátní pro daný protein a měřené podmínky.

### **Určení chemických posunů atomů proteinové páteře**

Přiřazení resonancí amidických párů ve 2D spektru  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC a z toho vyplývající určení chemických posunů H, N,  $\text{C}_\alpha$  a  $\text{C}_\beta$  bylo provedeno interpretací následujících 3D spekter: HNCACB, CBCA(CO)NH a HNCA. Spektrum HNCACB koreluje chemické posuny jader  $\text{H}^i$ ,  $\text{N}^i$  s  $\text{C}_\alpha^i$ ,  $\text{C}_\beta^i$  a také s  $\text{C}_\alpha^{i-1}$  a  $\text{C}_\beta^{i-1}$ . Spektrum CBCA(CO)NH koreluje chemické posuny jader  $\text{H}^i$ ,  $\text{N}^i$  pouze s  $\text{C}_\alpha^{i-1}$  a  $\text{C}_\beta^{i-1}$  (Obrázek 4-2). Kombinace spekter HNCACB a CBCA(CO)NH umožňuje tzv. sekvenční přiřazení, při kterém je nejprve určena sekvenční posloupnost  $\text{HNC}_\alpha/\text{C}_\beta$  troj-resonancí, reprezentujících určitý úsek proteinové páteře. Takto propojené  $\text{HNC}_\alpha/\text{C}_\beta$  troj-resonance mohou poté být jednoznačně přiřazeny konkrétnímu úseku proteinové páteře, neboť kombinace hodnot chemického posunu  $\text{C}_\alpha$  a především  $\text{C}_\beta$  závisí na typu aminokyseliny a jejich znalost umožňuje buď jednoznačně určit, nebo alespoň zúžit výběr typu aminokyseliny, které dané resonance přísluší. Experiment HNCA neposkytuje informaci o  $\text{C}_\beta$ , ale je z výše uvedených 3D experimentů nejcitlivější. Spektrum HNCA bylo použito pro upřesnění chemických posunů H, N,  $\text{C}_\alpha$  a rozlišení krosníků v oblastech spektra, kde docházelo k překryvům.

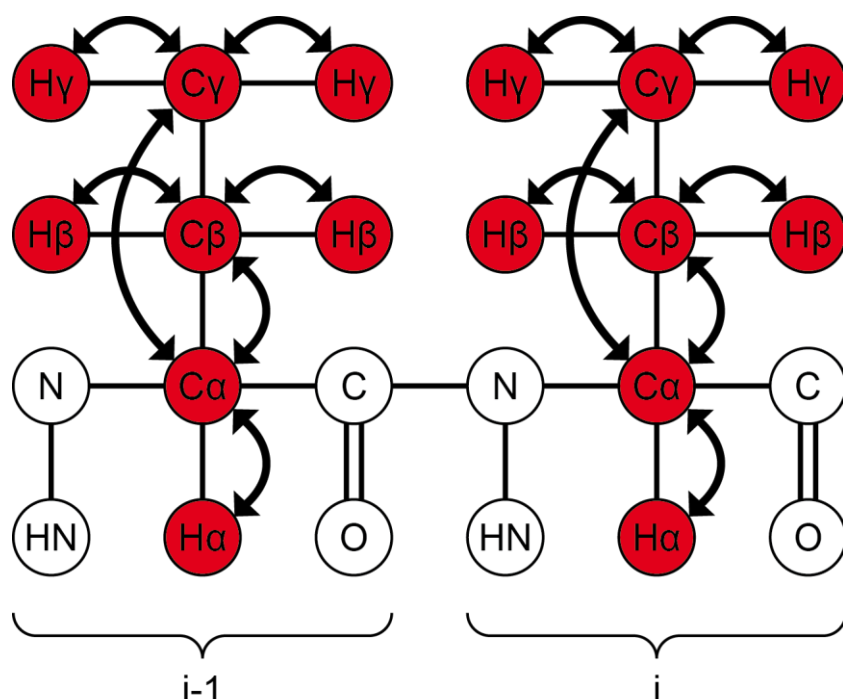


**Obrázek 4-2: Trojresonanční experimenty korelující HN a C $\alpha$  (C $\beta$ ).** Trojresonanční experimenty použité pro přiřazení NH skupin proteinové páteře. Detekovaná jádra jsou zobrazena červeně, jádra zapojena do přenosu magnetizace modře. Přenos magnetizace je naznačen šipkami. Nahoře: HNCA experiment. Uprostřed: CBCA(CO)NH experiment. Dole: HNCACB experiment.

Experiment HNCO koreluje chemické posuny  $H^i$ ,  $N^i$  s  $C^{i-1}$ . Přiřazení resonancí  $^{13}C$  karbonylové skupiny byly určeny pomocí HNCO spektra ze známých informací o chemických posunech H a N.

### Určení chemických posunů postranních řetězců

Chemické posuny atomů  $C_\alpha$  a  $C_\beta$  byly určeny přiřazením resonancí ve spektrech HNCACB či CBCA(CO)NH. Chemické posuny ostatních uhlíkových a vodíkových atomů, které byly součástí alifatické části postranních řetězců, byly určeny přiřazením resonancí ve spektru TOCSY, které koreluje chemické posuny obou atomů  $CH_x$  skupiny postranního řetězce a dalšího vodíkového atomu ze stejného postranního řetězce (Obrázek 4-3).



**Obrázek 4-3: TOCSY experiment.** Přenos magnetizace je naznačen šipkami. Pomocí TOCSY experimentu je možné přiřadit resonance  $CH$  skupin postranních řetězců.

### NOESY

Nukleární Overhauserův efekt (NOE) je jev, při kterém se magnetizace mezi atomovými jádry přenáší prostorem nezávisle na chemické vazbě. Na tomto jevu založený NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) experiment umožňuje korelovat chemické posuny jader, která jsou ve vzájemné blízkosti. Jelikož intenzita NOE je nepřímo úměrná šesté mocnině vzdálenosti, je tento efekt prostorově omezen a jeho praktický limit činí 5,5 Å. Z těchto důvodů NOESY spektra obsahují

informace o prostorové uspořádání polypeptidového řetězce a při výpočtu 3D struktury proteinu hrají nejdůležitější roli.

NOESY experimenty korelují chemické posuny dvojic jader  $^1\text{H}$ , která jsou od sebe vzdálena méně než 5,5 Å. Jelikož takových dvojic obecně může být v polypeptidovém řetězci velmi mnoho - v závislosti na jeho délce i několik tisíc a více, korelují NOESY experimenty ještě chemický posun jádra buď  $^{13}\text{C}$  nebo  $^{15}\text{N}$ , který je s jedním z dvojice prostorově spřažených jader kovalentně spojen. Výsledná NOESY spektra jsou tedy buď  $^{13}\text{C}$ - nebo  $^{15}\text{N}$ - editovaná. Editace jiným druhem jádra účinně eliminuje možnost překryvu krosníků a velmi usnadňuje přiřazení resonancí.

### **Měření závislosti chemických posunů $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ na teplotě a pH**

Jak již bylo řečeno,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC experiment je citlivý na podmínky, za jakých probíhá jeho měření. Mezi základní akviziční podmínky, kterými je možné ovlivnit chemické posuny v  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektru, patří teplota a pH. Se snižující teplotou dochází k omezení nebo zpomalení intramolekulárních pohybů. S klesajícím pH se zpomaluje protonová výměna amidové skupiny s vodou. Akviziční podmínky by měly být pro každý protein optimalizovány tak, aby bylo možné v  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektru identifikovat co nejvíce resonancí náležejících amidovým skupinám proteinové páteře.

### **Kombinovaná změna chemického posunu**

Porovnávání chemických posunů mezi jednotlivými vzorky se provádí pomocí kombinované změny chemického posunu, která se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$\Delta\delta = \sqrt{\Delta\delta_{\text{H}}^2 + \left(\frac{\Delta\delta_{\text{N}}}{5}\right)^2}$$

Chemické posuny v N a H dimenzích obecně nejsou na sobě závislé a na změnu podmínek mohou v případě jednotlivých NH párů reagovat různým způsobem. Kombinovaná změna chemického posunu umožňuje vyčíslit změnu chemického posunu v rámci celé amidové skupiny.

### **$^1\text{H}$ - $^2\text{H}$ výměna**

Chemická výměna amidických vodíků s vodou je značně ovlivněna strukturou proteinu. Amidové skupiny exponované na povrchu proteinu jsou lépe přístupné

rozpouštědla a výměna u nich probíhá mnohem rychleji než u těch, které jsou ukryty před rozpouštědlem uvnitř struktury proteinu. Pokud je vzorek proteinu převeden do  $^2\text{H}_2\text{O}$ , proběhne výměna  $^1\text{H}$  za  $^2\text{H}$ , což se projeví poklesem intenzity signálu pocházejícího od vyměněných vodíků. Porovnáním míry úbytku intenzity NH resonancí v čase je možné zjistit relativní míru přístupnosti  $^1\text{H}$  –  $^2\text{H}$  výměně u jednotlivých NH skupin.

Pro měření závislosti  $^1\text{H}$  –  $^2\text{H}$  výměny na čase bylo 500  $\mu\text{l}$  1M roztoku CANTD v pufru A lyofilizováno. Těsně před měřením byl lyofilizovaný protein rozpuštěn v 500  $\mu\text{l}$   $^2\text{H}_2\text{O}$  a ihned přenesen do kyvety pro NMR spektroskopii. Akvizice dat byla spuštěna nejpozději do 15 minut od rozpuštění proteinu.

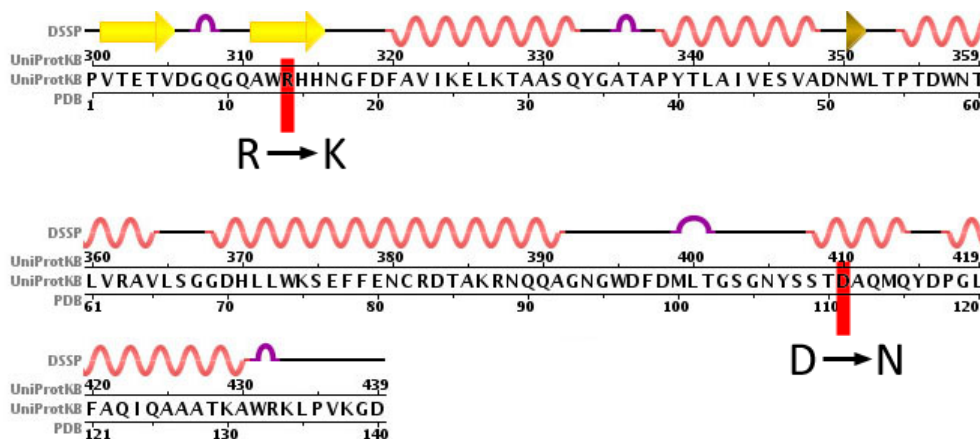
Relativní rychlost  $^1\text{H}$  –  $^2\text{H}$  výměny pro jednotlivé úseky proteinové páteře byla určena z časové závislosti intenzity HN krosníků.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektra CANTD rozpuštěného v  $^2\text{H}_2\text{O}$  byla snímána v časových intervalech nejprve po 10 min, poté po 1h a dále podle změny intenzity krosníků. Analýza spekter byla provedena pomocí programu CcpNmr Analysis.



## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Výběr mutací v CA NTD pro strukturní analýzu

3D struktura M-PMV CA NTD, vyřešená pomocí NMR spektroskopie, je tvořena N-terminální  $\beta$ -smyčkou a svazkem šesti  $\alpha$ -helixů (Macek *et al.*, 2009).  $\beta$ -smyčka je stabilizována solným můstkem mezi Pro1 a Asp57 a doprovodnými interakcemi mezi postranními řetězci  $\beta$ -smyčky a helixem 5 (Macek *et al.*, 2009; Obr 2010; Obr 2012). Mutační studie helixu 5 ukázala, že tento region je nezbytný pro složení a stabilizaci zralé částice (Obr 2010). Pro doprovodné interakce má klíčový význam postranní řetězec Arg14 nacházející se v  $\beta$ -smyčce (Obr 2012). Ze série assembly-inkompetentních mutantů, zkoumaných ve výše uvedené bakalářské a diplomové práci, byla na základě biochemických dat vybrány mutace R14K a D111N (Obrázek 5-1), jejichž dopad na strukturu byl analyzován pomocí NMR spektroskopie. Účelem této studie bylo zjistit, jak se mutace v regionu  $\beta$ -smyčky a helixu 5 promítnou do struktury CA NTD.



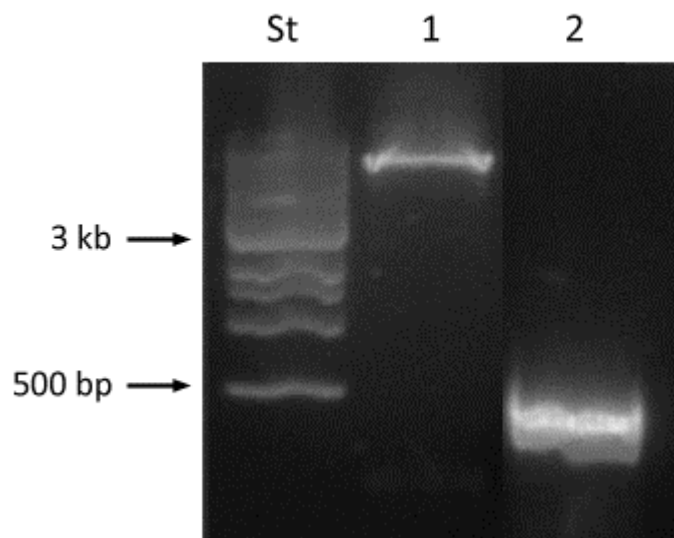
**Obrázek 5-1: Schematické znázornění sekundární struktury M-PMV CA NTD.** Motivy sekundární struktury jsou barevně odlišeny – žlutá:  $\beta$ -skládaný list, světle červená:  $\alpha$ -helix, fialová: ohyb. Červeným obdélníkem jsou vyznačeny bodové mutace, jejichž dopad na strukturu proteinu byl zkoumán.

Ze série mutantů v helixu 5 byla vybrána mutace D111N. Tato mutace narušila skládání v bakteriálním expresně/skládacím systému (Obr 2010). Účelem zkoumání struktury tohoto mutantu bylo prověřit hypotézu, jestli náboj Asp111 hraje roli ve stabilizaci  $\beta$ -smyčky pomocí elektrostatické interakce s postranním řetězcem aminokyseliny v  $\beta$ -smyčce. Náhrada za asparagin byla provedena, aby byl zrušen náboj, ale ve sterických nárocích postranního řetězce byla co nejmenší změna.

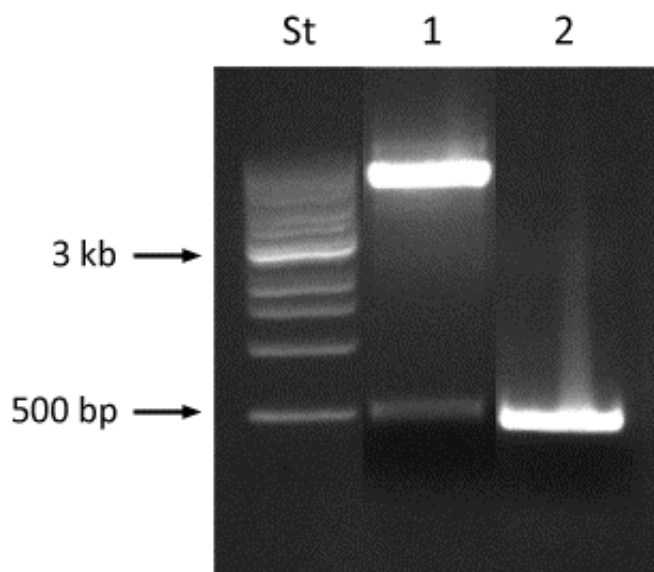
Mutace R14A, R14E a R14K v proteinu CA NTD měly ve všech případech obdobný dopad na biologickou funkci proteinu. Tyto mutace narušily skládání jak v bakteriálních, tak tkáňových buňkách a zcela potlačily infektivitu viru M-PMV (Obr 2012). Pro strukturní studii byla vybrána isopolární záměna za lysin (R14K), aby byla v chemickém okolí residua na pozici 14 co nejmenší změna a mohl být objasněn klíčový význam zcela nezastupitelného Arg14 pro skládání virových částic.

## 5.2 Příprava vektorů pro expresi CA NTD

Úsek DNA kódující prvních 140 aminokyselin kapsidového proteinu M-PMV, které odpovídají jeho N-terminální doméně (CA NTD 1-140), obsahující mutaci D111N respektive R14K byl amplifikován pomocí PCR. Jako templát byl použit plasmid pET22b obsahující konstrukt kódující CANC fúzní protein M-PMV (pET22b CANC) s příslušnou mutací. PCR produkt a plasmidová DNA pET22b byly štěpeny enzymy *XhoI* a *XbaI*. PCR fragmenty po restričním štěpení (Obrázek 5-2 a 5-3, dráha 2) byly ligovány do plasmidu pET22b (Obrázek 5-2 a 5-3, dráha 1). Výsledné konstrukty byly nazvány pET22b CA NTD 1-140 D111N a pET22b CA NTD 1-140 R14K, a z nich exprimované proteiny CA NTD D111N a CA NTD R14K. Správné vložení fragmentů bylo ověřeno restričním experimentem. V případě pozitivního výsledku byla sekvence plasmidové DNA verifikována sekvenováním.



**Obrázek 5-2: Elektroforetická analýza DNA fragmentu po PCR a následném restričním štěpení.** 1% agarosový gel, barveno GelRed NA stain. Jako standard (St) byl použit NEB 1 kb ladder. V dráze 1 se nachází plasmidová DNA pET22b štěpená restričními enzymy *XhoI* a *XbaI* (fragment 5321 bp). Dráha 2 představuje produkt PCR amplifikace nesoucí mutaci D111N (464 bp).

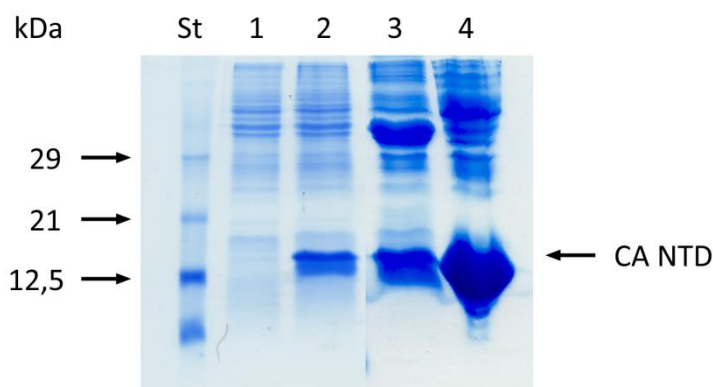


**Obrázek 5-3: Elektroforetická analýza DNA fragmentů po PCR a následném restrikčním štěpení.** 1% agarosový gel, barveno GelRed NA stain. Jako standard (St) byl použit 1 kb ladder. V dráze 1 se nachází plasmidová DNA pET22b CANTD štěpená restrikčními enzymy XhoI a XbaI (fragmenty 5321 a 464 bp). Dráha 2 představuje produkt PCR amplifikace nesoucí mutaci R14K (464 bp).

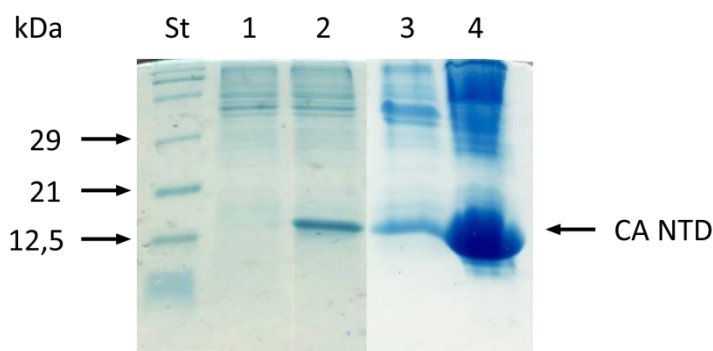
### 5.3 Exprese, izolace a purifikace CA NTD

Expresním vektorem pET22b kódujícím konstrukt CA NTD 1-140 D111N respektive CA NTD 1-140 R14K byly transformovány buňky *E. coli* BL21 STAR (DE3) dle protokolu uvedeného v sekci laboratorní postupy. Kontrolní exprese byla provedena v neznačeném LB médiu. Pro expresi  $^{13}\text{C}$  a  $^{15}\text{N}$  uniformně značeného proteinu bylo použito M9 minimální médium obsahující  $^{13}\text{C}$ -glukosu a  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ . Exprese CA NTD byla indukována přídávkem IPTG, jakmile  $\text{OD}_{590}$  dosáhlo hodnoty 0,7 – 0,9. Po 4 hodinách kultivace byly buňky sklizeny centrifugací. Na Obrázku 5-4 (D111N) a 5-5 (R14K) je uvedena elektroforetická analýza buněk před indukcí a po indukcí. Molekulová hmotnost CA NTD je 15 455 Da.

Buněčná peleta byla dezintegrována postupem uvedeným v sekci laboratorní postupy. Obsah CA NTD v peletovaných buněčných zbytcích byl nízký (Obrázek 5-4 a 5-5, dráha 3), a proto byl dále zpracováván pouze supernatant po dezintegraci, který obsahoval CA NTD (Obr. 5-4 a 5-5, dráha 4).



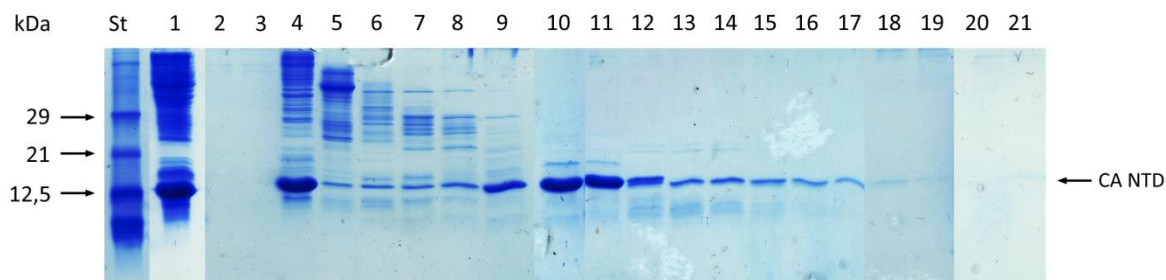
**Obrázek 5-4: Elektroforetická analýza exprese a izolace CA NTD D111N.** 18% polyakrylamidový gel, barveno Coomassie Brilliant Blue G-250. Jako standard byl použit Protein Test Mixture 4+5. Buněčná kultura byla kultivována, dokud její  $OD_{590}$  nedosáhla 0,7-0,9 (dráha 1). Poté byla pomocí IPTG indukována exprese CA NTD D111N. 4 hodiny po indukci byly buňky sklizeny centrifugací (dráha 2) a lyzovány. Poté byly nerozpustné buněčné zbytky peletovány ( $P_1$ , dráha 3) a odděleny od supernatantu ( $S_1$ , dráha 4).



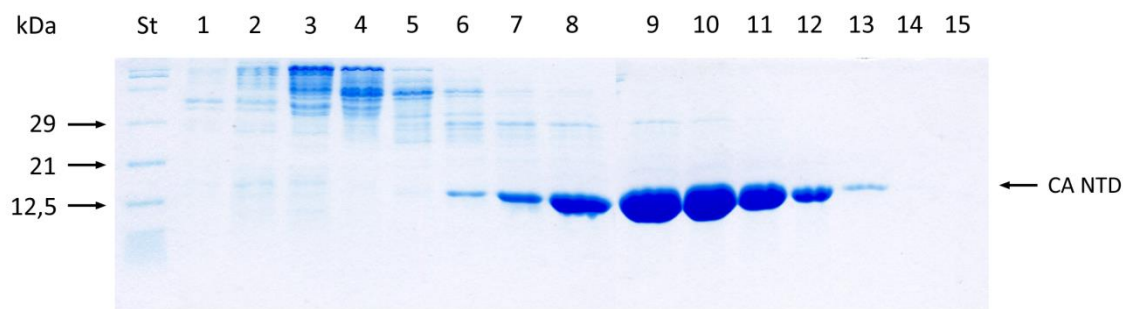
**Obrázek 5-5: Elektroforetická analýza exprese a izolace CA NTD R14K.** 18% polyakrylamidový gel, barveno Coomassie Brilliant Blue G-250. Jako standard (St) byl použit Protein Test Mixture 4+5. Buněčná kultura byla kultivována, dokud její  $OD_{590}$  nedosáhla 0,7-0,9 (dráha 1). Poté byla pomocí IPTG indukována exprese CA NTD R14K. 4 hodiny po indukci byly buňky sklizeny centrifugací (dráha 2) a lyzovány. Poté byly nerozpustné buněčné zbytky peletovány ( $P_1$ , dráha 3) a odděleny od supernatantu ( $S_1$ , dráha 4).

CA NTD byl od ostatních rozpustných proteinů v buněčném lyzátu separován pomocí gelové permeační chromatografie. Pro purifikaci CA NTD R14K (Obrázek 5-5) byla použita středotlaká chromatografie (FPLC), zatímco v případě CA NTD D111N (Obrázek 5-6) byla použita chromatografie za atmosferického tlaku. V obou případech byl rozpustný podíl buněčného lyzátu nanesen na chromatografickou kolonu (podrobnosti v sekci laboratorní metody a postupy) a byly jímány frakce rozdělené podle molekulové hmotnosti. Dělení proteinové směsi bylo analyzováno pomocí SDS-PAGE (Obrázek 5-6, 5-7). CA NTD D111N obsahovaly frakce 4-17 (Obrázek 5-6), CA NTD R14K obsahovaly frakce 6-13 (Obrázek 5-7). Frakce 4-9

(D111N) a 6-8 (R14K) byly znečištěny proteiny o vyšší molekulové hmotnosti a z toho důvodu nebyly dále použity. Frakce 10-17 (D111N) a 9-13 (R14K) byly spojeny a takto získaný, purifikovaný CA NTD byl v obou případech zahuštěn na koncentraci 1 – 2 mM (16 – 32 mg/ml). Z 800 ml kultivačního média bylo připraveno až 100mg CA NTD.



**Obrázek 5-6: Elektroforetická analýza purifikace CA NTD D111N.** 18% polyakrylamidový gel, barveno Coomassie Brilliant Blue G-250. Jako standard (St) byl použit Protein Test Mixture 4+5. Supernatant S1 po lyzi buněčné kultury exprimující CA NTD D111N byl purifikován pomocí gelové permeační chromatografie za atmosferického tlaku. V dráze 1 se nachází nástřík na chromatografickou kolonu. Dráhy 2-21 obsahují alikvóty z jednotlivých frakcí. Frakce 10-17 byly spojeny a použity pro další práci.



**Obrázek 5-7: Elektroforetická analýza purifikace CA NTD R14K.** 18% polyakrylamidový gel, barveno Coomassie Brilliant Blue G-250. Jako standard (St) byl použit Protein Test Mixture 4+5. Supernatant S1 po lyzi buněčné kultury exprimující CA NTD R14K byl purifikován pomocí středotlaké gelové permeační chromatografie. Dráhy 1-15 obsahují alikvóty z jednotlivých frakcí. Frakce 8-13 byly spojeny a použity pro další práci.

## 5.4 Přiřazení chemických posunů

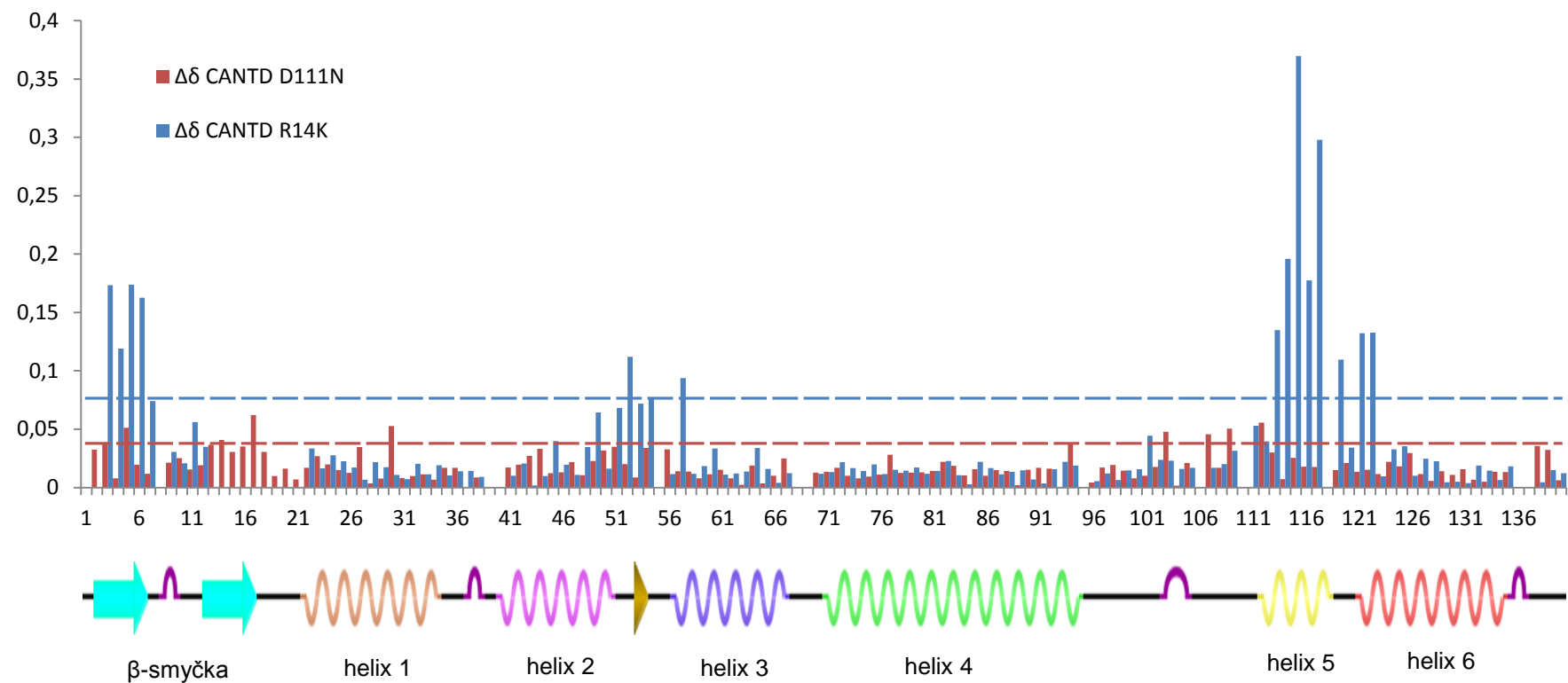
### 5.4.1 Přiřazení chemických posunů atomů proteinové páteře

Pro určení chemických posunů atomů proteinové páteře CANTD R14K a D111N byla použita spektra  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC, HNCA, HNCACB, CBCA(CO)NH a HNCO. Tato spektra korelují chemické posuny jader H a N a dalších jader proteinové páteře. Jako pomůcka pro přiřazení chemických posunů atomů mutantů CA NTD posloužila znalost chemických posunů jader CA NTD divokého typu.

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrum CANTD D111N bylo analyzováno a s pomocí výše uvedených troj-resonančních experimentů byly identifikovány resonance 126 HN párů a určeny jejich chemické posuny. V celkovém počtu 140 aminokyselin je pětkrát zastoupen prolin, který neobsahuje amidovou skupinu. Chemické posuny jader mutované aminokyseliny N111 se nepodařilo nalézt. Převážná většina HN párů vykazovala totožné chemické posuny jako divoký typ. Průměrná hodnota kombinované změny chemických posunů byla 0,019 a u 93% NH skupin nepřesahovala hodnota kombinované změny dvojnásobek průměru, tedy 0,038. Větší rozdíl byl pozorován pouze v případě aminokyselin v těsné blízkosti mutované pozice N111 a také u několika aminokyselin v  $\beta$ -smyčce (Graf 5-1).

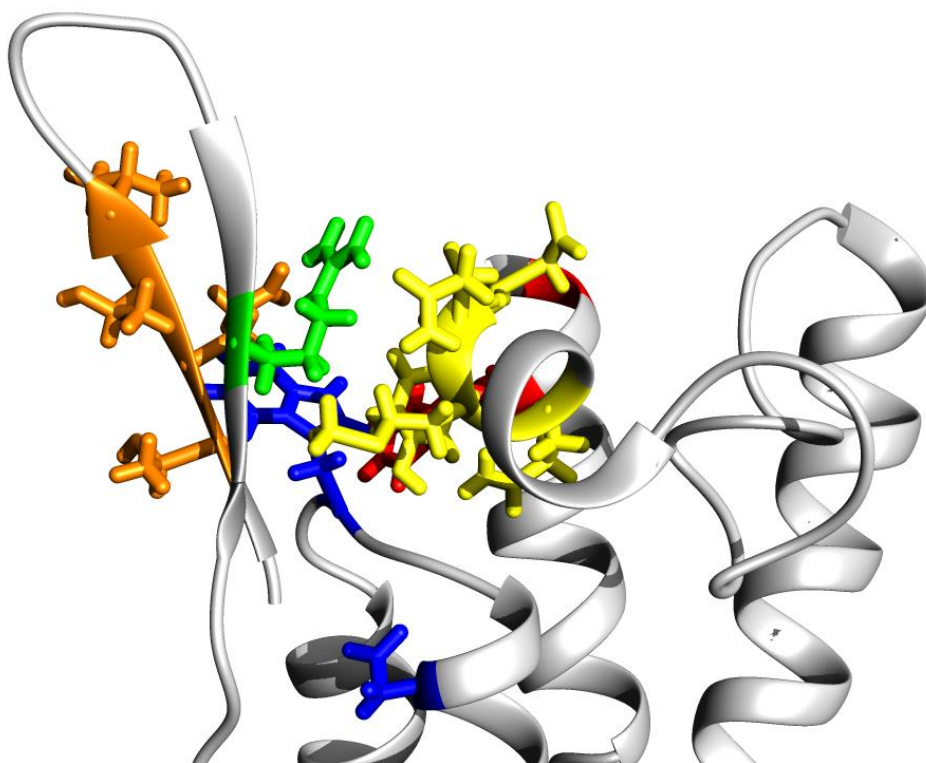
V případě CANTD R14K byly v  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektru přiřazeny resonance 119 HN párů. Resonance příslušející HN párům aminokyselin 13-21, včetně mutovaného K14, se nepodařilo jednoznačně přiřadit. Průměrná hodnota kombinované změny chemických posunů u CANTD R14K byla 0,038, tedy dvojnásobná, než v případě CANTD D111N. U 78% amidických skupin kombinovaná změna chemického posunu dosahovala hodnoty dvojnásobku průměru (tj. 0,077) nebo nižší. U 14 HN párů byly pozorovány značné rozdíly v chemických posunech oproti divokému typu. Nejvýraznější změny chemických posunů byly zaznamenány u píků reprezentujících aminokyseliny  $\beta$ -smyčky a dále ty, které se ve struktuře WT prostorově nacházely v blízkosti  $\beta$ -smyčky, tj. helix 5 a spojení mezi helixem 2 a 3 (Graf 5-1, Obrázek 5-8).

## Kombinovaná změna chemických posunů CANTD R14K a D111N



**Graf 5-1: Kombinovaná změna chemických posunů CANTD R14K a D111N.** Červené sloupce reprezentují hodnoty kombinované změny v porovnání s divokým typem pro jednotlivá residua CANTD D111N; modré pro CANTD R14K. Vodorovné čárkované čáry příslušných barev označují dvojnásobek průměrné hodnoty kombinované změny pro každý z proteinů. Pod osou X je schematicky znázorněna sekundární struktura divokého typu.





**Obrázek 5-8: Residua s největšími změnami v chemické okolí důsledkem mutace R14K.** Na obrázku je znázorněna 3D struktura CANTD divokého typu. Arg14 je zvýrazněn zeleně. Aminokyseliny, jejichž NH skupiny měly nejvíce rozdílné chemické posuny v  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektru CANTD divokého typu a R14K, jsou barevně zvýrazněny: oranžová –  $\beta$ -smyčka (Thr3, Glu4, Thr5, Val6); modrá – smyčka mezi helixy 2/3 a helix 3 (Trp52, Asp57); žlutá – helix5 a smyčka mezi helixy 5/6 (Gln113, Met114, Gln115, Tyr116, Asp117); helix6 (Gly119, Phe121, Ala122).

#### 5.4.2 Přiřazení chemických posunů atomů postranních řetězců

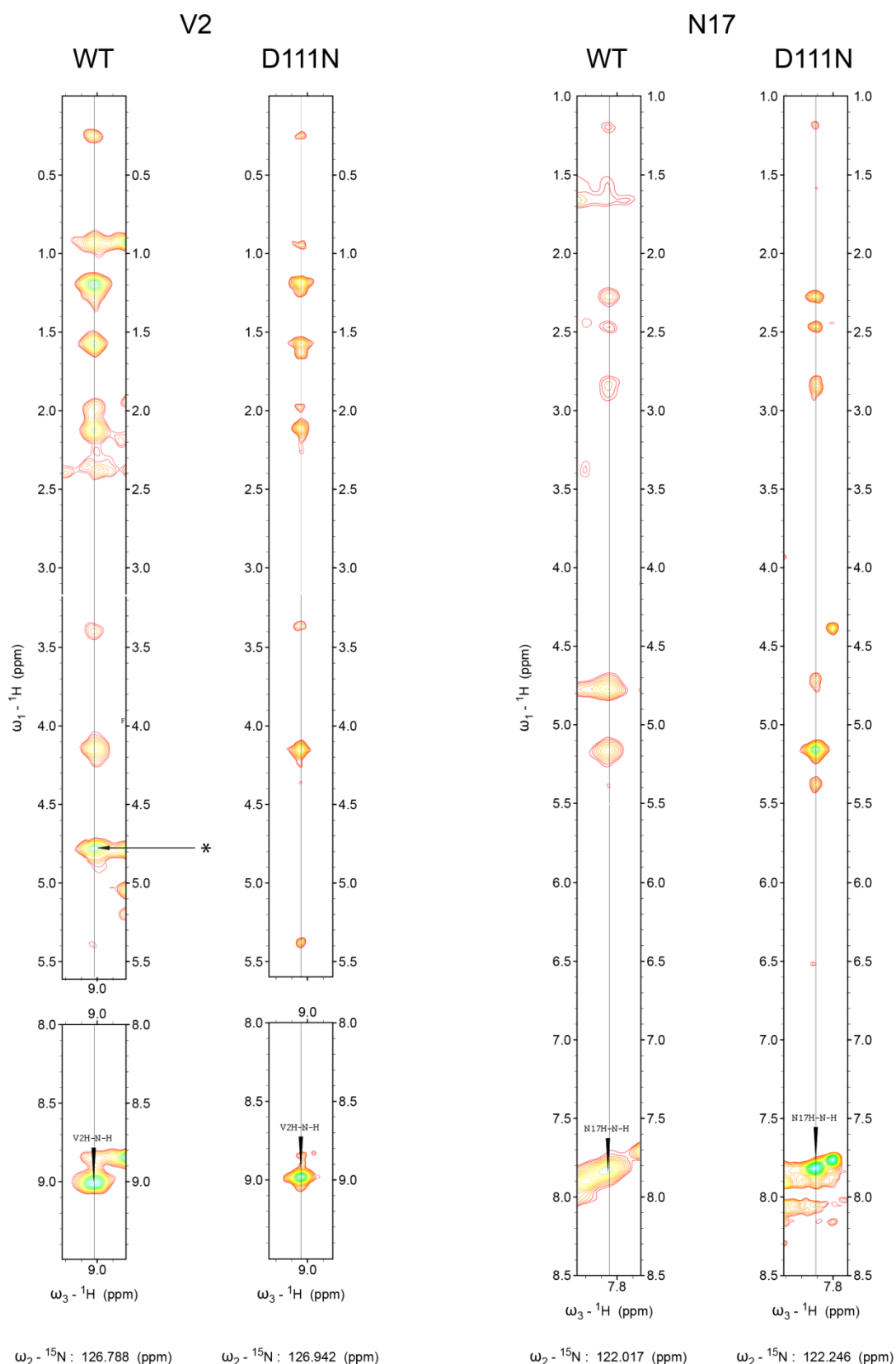
Pro přiřazení chemických posunů atomů C a H v postranních řetězcích proteinu CANTD D111N bylo použito spektrum TOCSY a troj-resonanční spektra korelující C $\alpha$  nebo C $\beta$ . Podařilo se přiřadit 80% resonancí alifatických CH skupin postranních řetězců, které byly viditelné v  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektru.

#### 5.5 Porovnání NOESY spektra divokého typu a D111N

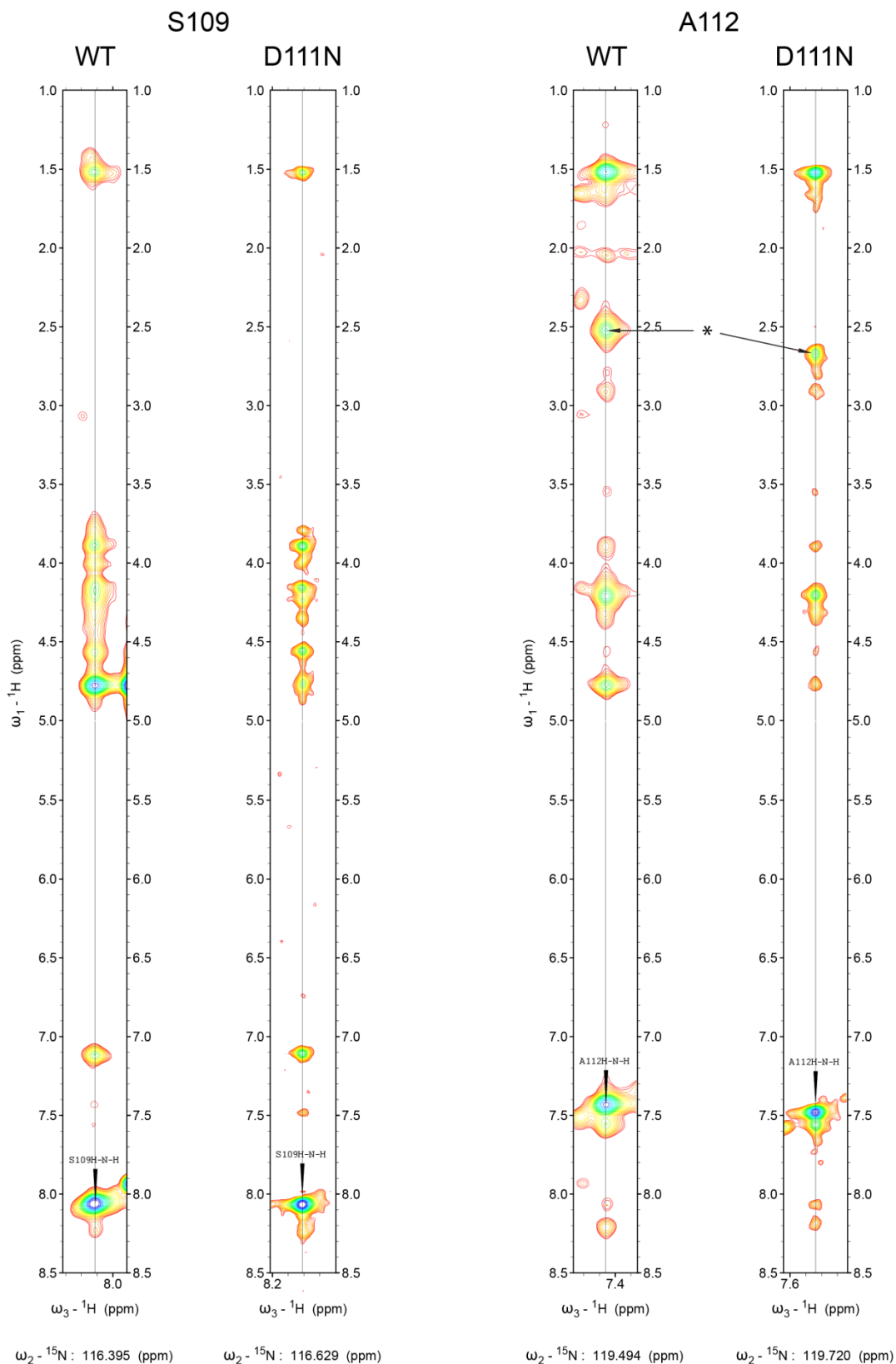
Vzhledem k velmi výrazné podobnosti  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spekter CANTD divokého typu a D111N nebyl očekáván výrazný rozdíl v prostorové struktuře, tedy ani u většiny NOE kontaktů měřitelných u těchto proteinů. Pro názornost jsou zde porovnány prostorové kontakty pouze aminokyselin, které se necházely v těsné blízkosti mutované aminokyseliny 111 a které se ve 3D struktuře nacházely naproti této pozici – v  $\beta$ -smyčce. Případné změny ve strukturním uspořádání proteinu by byly nejlépe pozorovatelné právě v tomto regionu.



V  $^{15}\text{N}$ -NOESY spektru CANTD divokého typu a D111N byly porovnány NOE kontakty amidových skupin V2, D17 (Obrázek 5-9), S109 a A112 (Obrázek 5-10). Kvůli mírně odlišným chemickým posunům N111-H $\beta$  a D111-H $\beta$  byly krosníky odpovídající kontaktům těchto atomů s NH skupinou A112 patřičně posunuté. U ostatních sledovaných skupin atomů nebyly nalezeny signifikantní rozdíly v počtu či pozici krosníků v NOESY spektru CANTD divokého typu a D111N.



**Obrázek 5-9: Srovnání vybraných oblastí NOESY spektra.** Velikosti chemických posunů  ${}^1\text{H}$  resonancí v přímé doméně (Y-souřadnice) charakterizují atomy nacházející se v blízkosti dané NH skupiny. Resonance označené hvězdičkou odpovídají chemickému posunu vody (4,79) a jedná se o častý artefakt při zpracování spektra.



**Obrázek 5-10: Srovnání vybraných oblastí NOESY spektra.** Velikosti chemických posunů  ${}^1\text{H}$  rezonancí v přímé doméně (Y-souřadnice) charakterizují atomy nacházející se v blízkosti dané NH skupiny. Resonance označené hvězdičkou odpovídají kontaktům H $\beta$ -D111 a H $\beta$ -N111 s A112-N-H.

## 5.6 Teplotní a pH závislost chemických posunů

Ve snaze nalézt hodnoty chemických posunů jader amidických skupin residuů 13-21 CANTD R14K byla provedena měření  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektra za různých podmínek. Byl testován vliv teploty a pH na velikost chemických posunů a intenzitu resonancí v  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektru.

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrum CANTD R14K bylo měřeno při pH 8,0; 7,5; 7 a 6,5. Cílem měření při sníženém pH bylo zpomalit výměnu protonů amidických skupin s vodou a tímto zvýšit intenzitu krosníků v HN spektru. Vliv pH na chemický posun byl zanedbatelný. Naproti tomu intenzita krosníků u spektra měřeného při pH 6,5 se zvýšila oproti spektru měřenému při pH 8,0 a bylo možné ve spektru nalézt několik krosníků, které měly při pH 8,0 intenzitu na úrovni šumu. Vzhledem k tomu, že chemický posun  $\text{C}\alpha$  a  $\text{C}\beta$  příliš nezávisí na pH, stačilo pro přiřazení resonancí těchto krosníků pH 6,5 naměřit CBCACONH experiment. Bylo zjištěno, že krosníky, které se nacházejí ve  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektru při pH 6,5, ale nikoliv při pH 8,0, patří amidovým skupinám Gly8, Gly68, Gly69 a Gly95, které při pH 8,0 není možné nalézt ani v  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektru divokého typu.

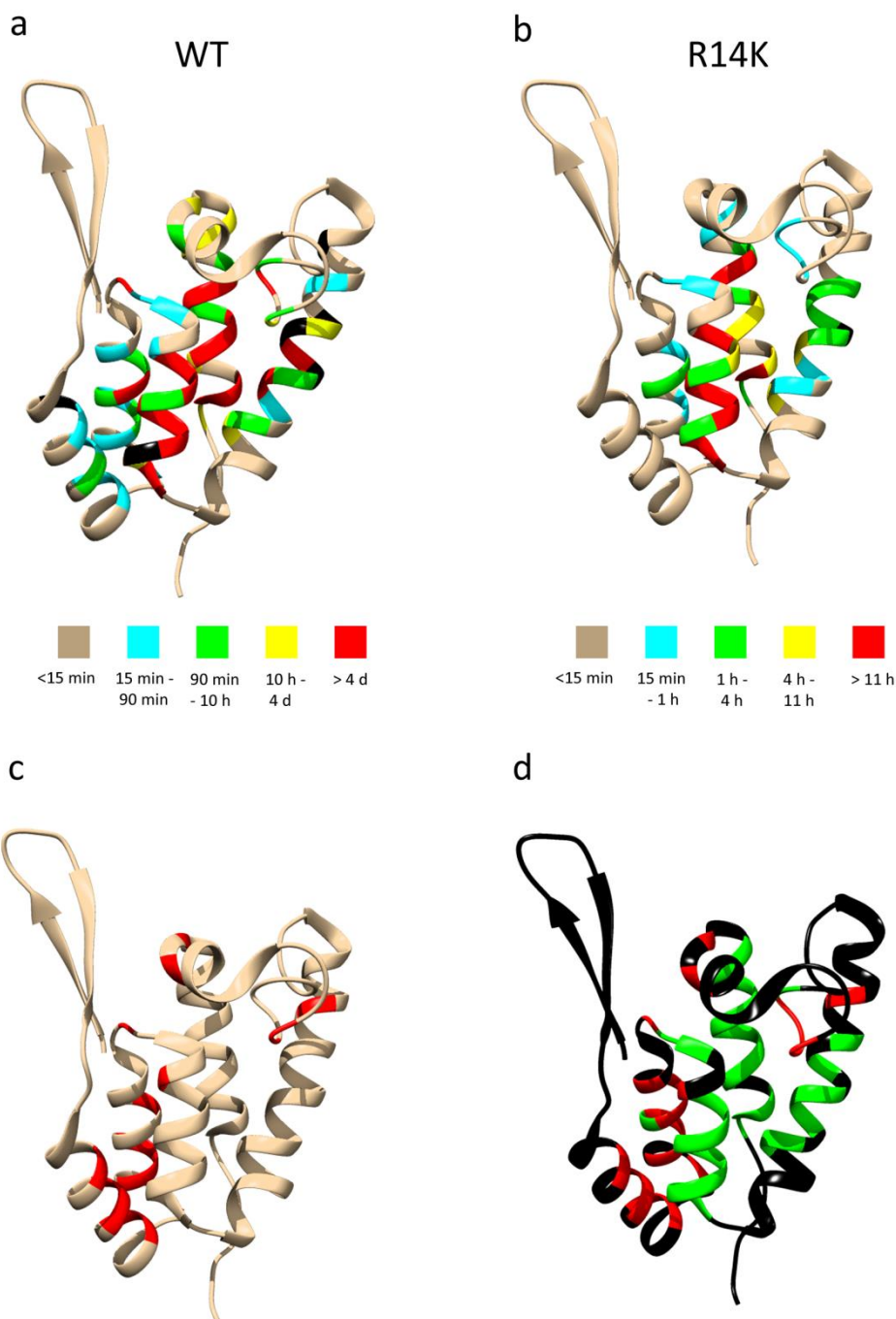
Účelem měření  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  spekter při snížené teplotě bylo zpomalit chemickou výměnu vodíku mezi amidickou skupinou a vodou. Spektra byla měřena při teplotách 25, 15, 10 a 5°C. Bylo zjištěno, že chemické posuny jader HN se při různých teplotách signifikantně mění. Chemický posun jader  $^1\text{H}$  se snižoval se snižující se teplotou. Závislost chemického posunu  $^{15}\text{N}$  na teplotě nebyla uniformní a se snižující teplotou se u různých jader chemický posun měnil oběma směry.

Podmínky, za kterých by bylo možné v  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektru jednoznačně identifikovat resonance jader NH skupin residuů 13-21, se dosud najít nepodařilo.

## 5.7 $^1\text{H}$ - $^2\text{H}$ výměna

Měřením časové závislosti  $^1\text{H}$ - $^2\text{H}$  výměny byla zkoumána přístupnost amidických skupin pro rozpouštědlo u CANTD divokého typu a R14K. Výměna proběhla celkově rychleji u CANTD R14K než u divokého typu. Rychlost výměny u jednotlivých NH skupin R14K a divokého typu proto nebyla porovnávána přímo, ale ve vztahu ke střední rychlosti výměny u příslušného vzorku CANTD. Krosníky, které se v HN spektru překrývaly a nebylo možné odděleně určit jejich intenzity, nebyly zahrnuty do výsledků (Obrázek 5-11; panel a, b).

Ke kompletní výměně 34 NH skupin CANTD divokého typu došlo v rozmezí 15 min až 4 dny. V případě CANTD R14K došlo ke kompletní výměně 26 NH skupin v rozmezí 15 minut až 11 h. Po 4 dnech v případě divokého typu a 11 h v případě R14K se již intenzita píků neměnila a experiment byl ukončen. Během této doby neproběhla kompletní výměna 16 NH skupin u CANTD divokého typu a 8 u R14K. U 82 NH skupin CANTD divokého typu došlo ke kompletní výměně ještě před naměřením prvního  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC experimentu. Obdobný jev nastal u 98 NH skupin CANTD R14K. Subtrakce těchto dvou množin poskytla úseky proteinové páteře, jejichž HN resonance měly signál v nejrychleji naměřeném spektru tohoto experimentu u divokého typu, ale nikoliv u R14K (Obrázek 5-11, panel c). V případě NH skupin R14K a divokého typu, kde výměna proběhla rychleji, než byl změřen první experiment, nebylo možné parametry výměny porovnat. Proteinová páteř CANTD byla podle relativní rychlosti  $^1\text{H}$ - $^2\text{H}$  výměny amidických vodíků rozdělena na úseky, u kterých k výměně došlo s porovnatelnou rychlostí (Obrázek 5-11; panel d), u kterých výměna proběhla výrazně rychleji u R14K než u divokého typu (Obrázek 5-11; panel d), a na úseky, které naměřená data neumožňovala porovnat (Obrázek 5-11; panel d).



**Obrázek 5-11: Rychlost  $^1\text{H}$ - $^2\text{H}$  výměny CANTD divokého typu a R14K.** Všechny modely představují strukturu proteinové páteře CANTD divokého typu (Macek *et al.*, 2009; pdb kód: 2kgf). Výsledky experimentu jsou vyjádřeny barevným rozlišením jednotlivých segmentů proteinové páteře. Panel a, b: doba potřebná k  $^1\text{H}$ - $^2\text{H}$  výměně u jednotlivých NH skupin divokého typu respektive R14K. Panel c: červená barva – regiony R14K více exponované rozpouštědлу než WT. Panel d: zelená barva – srovnatelná rychlost výměny u WT a R14K, červená barva – výměna signifikantně rychlejší u R14K, černá barva – žádná data, výměna proběhla před měřením.

## 6 DISKUZE

Zrání retrovirové částice doprovází reorganizace vnitřního prostoru virionu, vyvolaná rozštěpením polyproteinového prekurzoru Gag, a také konformační změny v jeho jednotlivých doménách. CA je uvolněn z nezralé sítě a vytváří zralé core, přičemž tyto procesy jsou řízeny změnami v terciární struktuře CA po uvolnění N- a C- konce. Bharat *et al.* (2012) ukázal, že pozice a role obou domén CA jsou v nezralé a zralé částici vyměněné a vlastní interakční rozhraní zahrnuje odlišné postranní řetězce, neboť vzájemná pozice regionů účastnících se interakce je mírně pozměněna. Charakteristickým znakem zralého CA je N-terminální  $\beta$ -smyčka. Její tvorba destabilizuje nezralou konformaci a navozuje zralou, ačkoliv není známo, že by se  $\beta$ -smyčka přímo podílela na intermolekulárních kontaktech ve zralé síti.  $\beta$ -smyčka je tvořena interakcí mezi Pro1 a Asp57 u M-PMV (Wildová *et al.*, 2008) a Asp53 u HIV-1 (Gitti *et al.*, 1996). Autoři NMR strukturní studie M-PMV CA NTD diskutují možnost další stabilizace  $\beta$ -smyčky pomocí doprovodné interakce s postranními řetězci v helixu 5 (Macek *et al.*, 2009).

Předešlé mutační studie prokázaly důležitost helixu 5 pro skládání a zrání virových částic M-PMV (Obr 2010) a klíčový význam Arg14 při tvorbě  $\beta$ -smyčky. Domnělá interakce mezi Arg14 a Asp111 z helixu 5 však byla vyvrácena (Obr 2012). Dalším krokem k charakterizaci interakčního rozhraní mezi  $\beta$ -smyčkou a helixem 5 bylo posouzení konkrétního vlivu mutací na terciární strukturu CA NTD, zejména na regiony účastnící se stabilizace  $\beta$ -smyčky. Z toho důvodu byly vybrány mutace D111N a R14K a jejich dopad na strukturu CA NTD byl analyzován pomocí NMR spektroskopie. Mutace D111N byla zvolena, neboť prvotní screening skládání VLP v bakteriálním expresním/skládacím systému naznačoval, že by mohla ovlivňovat skládání virových částic M-PMV (Obr 2010). V té době ještě nebyl formulován jednoznačný závěr ohledně neexistence přímé elektrostatické interakce mezi Arg14 a Asp111 (Obr 2012). Isopolární záměna R14K byla navržena tak, aby se chemické okolí postranního řetězce v pozici 14 změnilo co nejméně a tím pádem mohl být objasněn význam zcela nezastupitelného Arg14. Dalším důvodem pro výběr této mutace byl méně dramatický dopad na štěpení prekurzoru Gag, než tomu bylo v případě dalších testovaných mutací R14A a R14E, jejichž virové částice vykazovaly výrazné poruchy štěpení polyproteinového prekurzoru (Obr 2012).

Velké množství informací o obou proteinech nesoucích vybrané mutace poskytlo již základní  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektrum. Toto spektrum lze považovat za proteinový „otisk prstu“. V případě, že dva proteinové vzorky poskytnou identická  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektra, předpoklad o totožnosti jejich struktury je opodstatněný a vysoce pravděpodobný. Rozptýl chemických posunů v  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektru CANTD R14K a D111N prokázal, že oba proteiny jsou správně sbaleny. Velikost změny chemických posunů amidických skupin CANTD R14A a D111N oproti divokému typu signalizovala, že tyto mutace se neprojeví na celkovém sbalení proteinu a  $\alpha$ -helikální motív CANTD zůstal bez zásadních změn zachován. Tento závěr byl nutným předpokladem pro studium jemných změn na úrovni kontrapozice  $\beta$ -smyčky a zbytku molekuly.

Spektra CANTD D111N i R14K byla měřena při stejných podmínkách jako divoký typ (298K; pH 8,0) tak, aby jediným proměnným faktorem byla bodová mutace v primární struktuře proteinu. Zatímco u D111N bylo možné pomocí NMR experimentů naměřených za těchto podmínek přiřadit 93% NH resonancí proteinové páteře, u mutantu R14K pouze 88%, přičemž chybějící HN resonance byly soustředěny do souvislého úseku vymezeného pozicemi 13-21. Vzhledem k tomu, že tyto aminokyseliny se nacházejí v druhém řetězci  $\beta$ -smyčky v okolí zaměněné aminokyseliny Lys14, patří tato residua mezi klíčová pro tuto studii. Ve snaze optimalizovat podmínky měření  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC experimentů byly vyzkoušeny alternativní podmínky měření. Přestože se změnou teploty a pH podařilo přiřadit za původních podmínek neidentifikovatelné NH resonance (Gly8, Gly68, Gly69 a Gly95), podmínky, za kterých by bylo možné jednoznačně přiřadit NH resonance aminokyselin 13-21, se nalézt nepodařilo. I přes tuto mezeru v přiřazení bylo možné analyzovat ostatní přiřazené a pro tuto studii relevantní regiony CANTD, kterými jsou především první řetězec  $\beta$ -smyčky a helix 5.

Signifikantní změna chemických posunů jader amidických skupin proteinové páteře mutantu D111N se projevila pouze v případě mutovaného místa Asn111, jeho těsného okolí a několika dalších residuí v  $\beta$ -smyčce.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektra mutantu D111N a divokého typu byla do té míry identická, že se lze domnívat, že struktury obou proteinů jsou si natolik podobné, že nebudou použitou technikou rozlišitelné. K ověření této hypotézy byla porovnána NOESY spektra CANTD D111N a divokého typu. Stejně NOE kontakty v  $\beta$ -smyčce a helixu 5 potvrzují strukturní identitu obou



proteinů. Významná podobnost  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC a především NOESY spekter vedla k domněnce, že prostorová struktura mutantu D111N je prakticky totožná s divokým typem.

V porovnání s mutací D111N se mutace R14K projevila mnohem výraznějším způsobem na změnách chemických posunů amidových skupin v některých úsecích proteinové páteře oproti divokému typu. Amidické skupiny vykazující největší změny chemických posunů byly lokalizovány v  $\beta$ -smyčce, helixu 5 a spojení mezi helixy 2 a 3. Fakt, že záměna v  $\beta$ -smyčce se velmi výrazným způsobem projevila na chemických posunech residuů v helixu 5, dokládá blízkost a vzájemný kontakt těchto regionů ve strukturách jak CANTD divokého typu tak tohoto mutantu.

Pro ověření hypotézy, že při záměně R14K není  $\beta$ -smyčka v tak těsném spojení se zbytkem molekuly CANTD, byla naměřena závislost  $^1\text{H}$ - $^2\text{H}$  výměny amidických vodíků na čase pro CANTD divokého typu a R14K. K výměně amidických vodíků v regionech vystavených na povrchu proteinu, což se mimo jiné týkalo právě  $\beta$ -smyčky, došlo s vyšší rychlostí, než bylo možné tímto experimentem zaznamenat. Porovnáním časových intervalů, během kterých došlo ke kompletní výměně u ostatních NH skupin, byla odhalena místa proteinové páteře, která byla v případě CANTD R14K náchylnější k chemické výměně, než v případě divokého typu. Tato místa byla lokalizována především v helixech 1, 2, 5 a částečně také v helixu 3. Výsledky tohoto experimentu lze interpretovat tak, že u divokého typu se helixy 1-3 nacházely v kompaktním motivu a  $\beta$ -smyčka byla pevněji stabilizována helixem 5, čímž byl tento helix lépe chráněn před chemickou výměnou. Mutace R14K způsobila destabilizaci  $\beta$ -smyčky, helix 5 byl exponován rozpouštědлу a větší flexibilita  $\beta$ -smyčky vedla k odtažení helixu 1 od helixů 2 a 3, což se projevilo expozicí helixů 1-3. Především analýzou vlivu mutací v  $\beta$ -smyčce a helixu 5 na štěpení prekurzoru Gag bylo zjištěno, že destabilizace  $\beta$ -smyčky vede k odhalení alternativního štěpného místa rozeznávaného M-PMV proteasou v N-koncové části CA (Obr 2012). Také  $^1\text{H}$ - $^2\text{H}$  výměna provedená na HIV-1 CA potvrdila význam  $\beta$ -smyčky pro orientaci helixu 1 (Cortines *et al.*, 2011). Uvedené závěry jsou tedy v dobré shodě s výsledky obou souvisejících studií.

Jedním z možných vysvětlení, proč v  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spektru nelze nalézt některé konkrétní krosbíky je zrychlená chemická výměna atomů vodíku s vodou, která může být způsobena zvýšenou pohyblivostí proteinové páteře v oblasti  $\beta$ -

smyčky. Tato zvýšená pohyblivost je pravděpodobně důsledkem porušení antiparalelního dvojvláknového motivu skládaného listu, který tvoří základ  $\beta$ -smyčky na N-konci. Částečné rozvolnění tohoto motivu může být důsledkem záměny argininu za lysin.

Nevyřešenou otázkou zatím zůstává, proč se isopolární záměna Arg za Lys tak výrazně odrazí na struktuře CA a infektivě virových částic M-PMV (Obr 2012). Jednou z hypotéz je role velikosti nabitě skupiny na pozici 14. Guanidiniová skupina je mnohem větší a objemnější než primární aminoskupina a může se teoreticky účastnit více než jedné nekovalentní interakce najednou. Arginin v proteinech často zprostředkovává vícenásobné vodíkové vazby (Borders *et al.*, 1994). Takováto síť kontaktů může být relativně stabilní, i v případě slabších příspěvků jednotlivých interakcí. Tento mód nekovalentních interakcí v případě lysinu přirozeně není možný. Jedním z příspěvků této práce ke studované problematice skládání nezralých virových částic je vytipování nejpravděpodobnějších kandidátů pro nekovalentní interakci s Arg14. Bylo identifikováno 14 aminokyselin (Thr3, Glu4, Thr5, Val6, Trp52, Asp57, Gln113, Met114, Gln115, Tyr116, Asp117, Gly119, Phe121, Ala122), jejichž chemické okolí záměna argininu za lysin nejvíce ovlivnila. Pro finální posouzení tohoto stabilizačního rozhraní je nutné provést další mutační analýzy, aby bylo jasné, co je zdroj a co sekundární efekt předpokládané interakce.

## 7 SOUHRN

Závěry této diplomové práce jsou shrnuty v následujících bodech:

Byly připraveny plasmidové DNA pro expresi CANTD R14K a D111N.

CANTD R14K a D111N uniformně isotopově značené  $^{13}\text{C}$  a  $^{15}\text{N}$  byly připraveny expresí v *E. coli*, purifikovány pomocí gelové chromatografie a zahuštěny na koncentraci 1-2 mM pro měření NMR experimentů.

Pomocí  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC experimentu bylo ověřeno správné sbalení obou proteinů.

V případě proteinu CANTD D111N se podařilo přiřadit 93% resonancí jader proteinové páteře a přibližně 80% jader z alifatických postranních řetězců.

V případě CANTD R14K se podařilo přiřadit 88% resonancí jader proteinové páteře.

Identické chemické posuny NOESY resonancí v klíčových regionech divokého typu a CANTD D111N potvrdily totožnost obou struktur na úrovni chyby měření.

Kombinovaná změna chemického posunu amidických skupin prokázala, že záměna R14K se promítla jak do chemického okolí  $\beta$ -smyčky, tak helixu 5, a potvrdila, že tyto regiony nejsou tím pádem v tak těsném kontaktu jako v případě divokého typu.

Výsledky  $^1\text{H}$ - $^2\text{H}$  výměny doložily, že mutace R14K má za následek větší mobilitu  $\beta$ -smyčky a s tím spojenou expozici helixu 5 a rozvolnění svazku helixů 1-3.

Na základě markantní změny chemického okolí u 14 residuí mutantu R14K byla vytipována residua, která mohou být zapojena do rozhraní stabilizujícího  $\beta$ -smyčku.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Accola, M.A., Hoglund, S., Gottlinger, H.G. (1998): A putative alpha-helical structure which overlaps the capsid-p2 boundary in the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor is crucial for viral particle assembly. *J. Virol.* 72: 2072-2078.
- Anderson, E.C., Lever, A.M. (2006): Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein modulates its own translation. *J. Virol.* 80: 10478-10486.
- Arhel, N. (2010): Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology.* 7: 96.
- Bailey, G.D., Hyun, J.K., Mitra, A.K., Kingston, R.L. (2012): A structural model for the generation of continuous curvature on the surface of a retroviral capsid. *J. Mol. Biol.* 417: 212-223.
- Baltimore, D. (1970): RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226: 1209-1211.
- Bannert, K., Fiebig, U., Hohn, O. (2010): Retroviral particles, proteins and genomes. *In:* Kurth, R., Bannert, N., (eds.): *Retroviruses: Molecular Biology, Genomics and Pathogenesis*. Caister Academy Press, Norfolk, UK, 71- 106.
- Bartonova, V., Igonet, S., Sticht, J., Glass, B., Habermann, A., Vaney, M.C., Sehr, P., Lewis, J., Rey, F.A., Krausslich, H.G. (2008): Residues in the HIV-1 capsid assembly inhibitor binding site are essential for maintaining the assembly-competent quaternary structure of the capsid protein. *J. Biol. Chem.* 283: 32024-32033.
- Benjamin, J., Ganser-Pornillos, B.K., Tivol, W.F., Sundquist, W.I., Jensen, G.J. (2005): Three-dimensional structure of HIV-1 virus-like particles by electron cryotomography. *J. Mol. Biol.* 346: 577-588.
- Berthet-Colominas, C., Monaco, S., Novelli, A., Sibai, G., Mallet, F., Cusack, S. (1999): Head-to-tail dimers and interdomain flexibility revealed by the crystal structure of HIV-1 capsid protein (p24) complexed with a monoclonal antibody Fab. *EMBO J.* 18: 1124-1136.
- Bharat, T.A., Davey, N.E., Ulbrich, P., Riches, J.D., de Marco, A., Rumlova, M., Sachse, C., Ruml, T., Briggs, J.A. (2012): Structure of the immature retroviral capsid at 8 Å resolution by cryo-electron microscopy. *Nature* 487: 385-389.
- Bouamr, F., Cornilescu, C.C., Goff, S.P., Tjandra, N., Carter, C.A. (2005): Structural and dynamics studies of the D54A mutant of human T cell leukemia virus-1 capsid protein. *J. Biol. Chem.* 280: 6792-6801.
- Briggs, J.A., Wilk, T., Welker, R., Krausslich, H.G., Fuller, S.D. (2003): Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J.* 22: 1707-1715.
- Briggs, J.A., Grunewald, K., Glass, B., Forster, F., Krausslich, H.G., Fuller, S.D. (2006): The mechanism of HIV-1 core assembly: insights from three-dimensional reconstructions of authentic virions. *Structure.* 14: 15-20.
- Briggs, J.A., Riches, J.D., Glass, B., Bartonova, V., Zanetti, G., Krausslich, H.G. (2009): Structure and assembly of immature HIV. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106: 11090-11095.
- Briggs, J.A. Krausslich, H.G. (2011): The molecular architecture of HIV. *J. Mol. Biol.* 410: 491-500.
- Bukrinsky, M.I., Haggerty, S., Dempsey, M.P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M., Stevenson, M. (1993): A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 365: 666-669.
- Burniston, M.T., Cimarelli, A., Colgan, J., Curtis, S.P., Luban, J. (1999): Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein multimerization requires the nucleocapsid domain and RNA and is promoted by the capsid-dimer interface and the basic region of matrix protein. *J. Virol.* 73: 8527-8540.
- Butan, C., Winkler, D.C., Heymann, J.B., Craven, R.C., Steven, A.C. (2008): RSV capsid polymorphism correlates with polymerization efficiency and envelope glycoprotein content: implications that nucleation controls morphogenesis. *J. Mol. Biol.* 376: 1168-1181.

- Byeon, I.J., Meng, X., Jung, J., Zhao, G., Yang, R., Ahn, J., Shi, J., Concel, J., Aiken, C., Zhang, P., Gronenborn, A.M. (2009): Structural convergence between Cryo-EM and NMR reveals intersubunit interactions critical for HIV-1 capsid function. *Cell* 139: 780-790.
- Campbell, S., Vogt, V.M. (1995): Self-assembly in vitro of purified CA-NC proteins from Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 69: 6487-6497.
- Campbell, S., Vogt, V.M. (1997): In vitro assembly of virus-like particles with Rous sarcoma virus Gag deletion mutants: identification of the p10 domain as a morphological determinant in the formation of spherical particles. *J. Virol.* 71: 4425-4435.
- Carlson, L.A., Briggs, J.A., Glass, B., Riches, J.D., Simon, M.N., Johnson, M.C., Muller, B., Grunewald, K., Krausslich, H.G. (2008): Three-dimensional analysis of budding sites and released virus suggests a revised model for HIV-1 morphogenesis. *Cell Host. Microbe* 4: 592-599.
- Carlson, L.A., de Marco, A., Oberwinkler, H., Habermann, A., Briggs, J.A., Krausslich, H.G., Grunewald, K. (2010): Cryo electron tomography of native HIV-1 budding sites. *PLoS. Pathog.* 6: e1001173.
- Ceccherini-Silberstein, F., Malet, I., D'Arrigo, R., Antinori, A., Marcelin, A.G., Perno, C.F. (2009): Characterization and structural analysis of HIV-1 integrase conservation. *AIDS Rev.* 11: 17-29.
- Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M., Kim, P.S. (1997): Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89: 263-273.
- Coffin, J.M., Hughes, S.H., Varmus, H.E. (1997): The Interactions of Retroviruses and their Hosts. *In*: Coffin, J.M., Hughes, S.H., Varmus, H.E. (eds.): *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 335- 372.
- Conte, M.R., Matthews, S. (1998): Retroviral matrix proteins: a structural perspective. *Virology* 246: 191-198.
- Coren, L.V., Thomas, J.A., Chertova, E., Sowder, R.C., Gagliardi, T.D., Gorelick, R.J., Ott, D.E. (2007): Mutational analysis of the C-terminal gag cleavage sites in human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 81: 10047-10054.
- Cornilescu, C.C., Bouamr, F., Yao, X., Carter, C., Tjandra, N. (2001): Structural analysis of the N-terminal domain of the human T-cell leukemia virus capsid protein. *J. Mol. Biol.* 306: 783-797.
- Crist, R.M., Datta, S.A., Stephen, A.G., Soheilian, F., Mirro, J., Fisher, R.J., Nagashima, K., Rein, A. (2009): Assembly properties of human immunodeficiency virus type 1 Gag-leucine zipper chimeras: implications for retrovirus assembly. *J. Virol.* 83: 2216-2225.
- Dalton, A.K., Murray, P.S., Murray, D., Vogt, V.M. (2005): Biochemical characterization of rous sarcoma virus MA protein interaction with membranes. *J. Virol.* 79: 6227-6238.
- Datta, S.A., Zhao, Z., Clark, P.K., Tarasov, S., Alexandratos, J.N., Campbell, S.J., Kvaratskhelia, M., Lebowitz, J., Rein, A. (2007): Interactions between HIV-1 Gag molecules in solution: an inositol phosphate-mediated switch. *J. Mol. Biol.* 365: 799-811.
- Datta, S.A., Curtis, J.E., Ratcliff, W., Clark, P.K., Crist, R.M., Lebowitz, J., Krueger, S., Rein, A. (2007): Conformation of the HIV-1 Gag protein in solution. *J. Mol. Biol.* 365: 812-824.
- de Marco, A., Muller, B., Glass, B., Riches, J.D., Krausslich, H.G., Briggs, J.A. (2010): Structural analysis of HIV-1 maturation using cryo-electron tomography. *PLoS. Pathog.* 6: e1001215.
- Delelis, O., Carayon, K., Guiot, E., Leh, H., Tauc, P., Brochon, J.C., Mouscadet, J.F., Deprez, E. (2008): Insight into the integrase-DNA recognition mechanism. A specific DNA-binding mode revealed by an enzymatically labeled integrase. *J. Biol. Chem.* 283: 27838-27849.
- Ehrlich, L.S., Agresta, B.E., Carter, C.A. (1992): Assembly of recombinant human immunodeficiency virus type 1 capsid protein in vitro. *J. Virol.* 66: 4874-4883.
- Ernst, R.K., Bray, M., Rekosh, D., Hammariskjold, M.L. (1997): Secondary structure and mutational analysis of the Mason-Pfizer monkey virus RNA constitutive transport element. *RNA.* 3: 210-222.

- Forshey, B.M., von Schwedler, U., Sundquist, W.I., Aiken, C. (2002): Formation of a human immunodeficiency virus type 1 core of optimal stability is crucial for viral replication. *J. Virol.* 76: 5667-5677.
- Frankel, A.D., Young, J.A. (1998): HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 1-25.
- Freed, E.O. (1998): HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 251: 1-15.
- Gallay, P., Swingler, S., Song, J., Bushman, F., Trono, D. (1995): HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell* 83: 569-576.
- Gamble, T.R., Yoo, S., Vajdos, F.F., von Schwedler, U.K., Worthylake, D.K., Wang, H., McCutcheon, J.P., Sundquist, W.I., Hill, C.P. (1997): Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* 278: 849-853.
- Ganser-Pornillos, B.K., von Schwedler, U.K., Stray, K.M., Aiken, C., Sundquist, W.I. (2004): Assembly properties of the human immunodeficiency virus type 1 CA protein. *J. Virol.* 78: 2545-2552.
- Ganser-Pornillos, B.K., Cheng, A., Yeager, M. (2007): Structure of full-length HIV-1 CA: a model for the mature capsid lattice. *Cell* 131: 70-79.
- Ganser-Pornillos, B.K., Yeager, M., Sundquist, W.I. (2008): The structural biology of HIV assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18: 203-217.
- Ganser, B.K., Li, S., Klishko, V.Y., Finch, J.T., Sundquist, W.I. (1999): Assembly and analysis of conical models for the HIV-1 core. *Science* 283: 80-83.
- Gheysen, D., Jacobs, E., de Foresta, F., Thiriart, C., Francotte, M., Thines, D., De Wilde, M. (1989): Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* 59: 103-112.
- Ghez, D., Lepelletier, Y., Jones, K.S., Pique, C., Hermine, O. (2010): Current concepts regarding the HTLV-1 receptor complex. *Retrovirology*. 7: 99.
- Gitti, R.K., Lee, B.M., Walker, J., Summers, M.F., Yoo, S., Sundquist, W.I. (1996): Structure of the amino-terminal core domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* 273: 231-235.
- Gross, I., Hohenberg, H., Krausslich, H.G. (1997): In vitro assembly properties of purified bacterially expressed capsid proteins of human immunodeficiency virus. *Eur. J. Biochem.* 249: 592-600.
- Gross, I., Hohenberg, H., Wilk, T., Wieggers, K., Grattinger, M., Muller, B., Fuller, S., Krausslich, H.G. (2000): A conformational switch controlling HIV-1 morphogenesis. *EMBO J.* 19: 103-113.
- Hadravova, R., de Marco, A., Ulbrich, P., Stokrova, J., Dolezal, M., Pichova, I., Ruml, T., Briggs, J.A., Rumlova, M. (2012): In vitro assembly of virus-like particles of a gammaretrovirus, the murine leukemia virus XMRV. *J. Virol.* 86: 1297-1306.
- Hamard-Peron, E., Juillard, F., Saad, J.S., Roy, C., Roingeard, P., Summers, M.F., Darlix, J.L., Picart, C., Muriaux, D. (2010): Targeting of murine leukemia virus gag to the plasma membrane is mediated by PI(4,5)P2/PS and a polybasic region in the matrix. *J. Virol.* 84: 503-515.
- Hartman, T.R., Qian, S., Bolinger, C., Fernandez, S., Schoenberg, D.R., Boris-Lawrie, K. (2006): RNA helicase A is necessary for translation of selected messenger RNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13: 509-516.
- Ivanov, D., Tsodikov, O.V., Kasanov, J., Ellenberger, T., Wagner, G., Collins, T. (2007): Domain-swapped dimerization of the HIV-1 capsid C-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104: 4353-4358.
- Jin, L., Guzik, B.W., Bor, Y.C., Rekosh, D., Hammarskjold, M.L. (2003): Tap and NXT promote translation of unspliced mRNA. *Genes Dev.* 17: 3075-3086.
- Jouvenet, N., Neil, S.J., Bess, C., Johnson, M.C., Virgen, C.A., Simon, S.M., Bieniasz, P.D. (2006): Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. *PLoS Biol.* 4: e435.

- Karn, J. (2011): The molecular biology of HIV latency: breaking and restoring the Tat-dependent transcriptional circuit. *Curr. Opin. HIV. AIDS* 6: 4-11.
- King, A.M., Adams, M.J., Lefkowitz, E. (2011): Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Vol. 9, Elsevier, London, UK; Waltham, San Diego, USA.
- Kingston, R.L., Fitzon-Ostendorp, T., Eisenmesser, E.Z., Schatz, G.W., Vogt, V.M., Post, C.B., Rossmann, M.G. (2000): Structure and self-association of the Rous sarcoma virus capsid protein. *Structure* 8: 617-628.
- Klikova, M., Rhee, S.S., Hunter, E., Ruml, T. (1995): Efficient in vivo and in vitro assembly of retroviral capsids from Gag precursor proteins expressed in bacteria. *J. Virol.* 69: 1093-1098.
- Krausslich, H.G., Facke, M., Heuser, A.M., Konvalinka, J., Zentgraf, H. (1995): The spacer peptide between human immunodeficiency virus capsid and nucleocapsid proteins is essential for ordered assembly and viral infectivity. *J. Virol.* 69: 3407-3419.
- Larkin, M., Childs, R.A., Matthews, T.J., Thiel, S., Mizuochi, T., Lawson, A.M., Savill, J.S., Haslett, C., Diaz, R., Feizi, T. (1989): Oligosaccharide-mediated interactions of the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 that are independent of CD4 recognition. *AIDS* 3: 793-798.
- Larsson, E., Andersson, G. (1998): Beneficial role of human endogenous retroviruses: facts and hypotheses. *Scand. J. Immunol.* 48: 329-338.
- Li, S., Hill, C.P., Sundquist, W.I., Finch, J.T. (2000): Image reconstructions of helical assemblies of the HIV-1 CA protein. *Nature* 407: 409-413.
- Macek, P., Chmelik, J., Krizova, I., Kaderavek, P., Padrta, P., Zidek, L., Wildova, M., Hadravova, R., Chaloupkova, R., Pichova, I., Ruml, T., Rumlova, M., Sklenar, V. (2009): NMR structure of the N-terminal domain of capsid protein from the mason-pfizer monkey virus. *J. Mol. Biol.* 392: 100-114.
- Marcello, A. (2006): Latency: the hidden HIV-1 challenge. *Retrovirology* 3: 7.
- Martinez, N.W., Xue, X., Berro, R.G., Kreitzer, G., Resh, M.D. (2008): Kinesin KIF4 regulates intracellular trafficking and stability of the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein. *J. Virol.* 82: 9937-9950.
- Mateu, M.G. (2009): The capsid protein of human immunodeficiency virus: intersubunit interactions during virus assembly. *FEBS J.* 276: 6098-6109.
- Mayo, K., Huseby, D., McDermott, J., Arvidson, B., Finlay, L., Barklis, E. (2003): Retrovirus capsid protein assembly arrangements. *J. Mol. Biol.* 325: 225-237.
- Mbonye, U., Karn, J. (2011): Control of HIV latency by epigenetic and non-epigenetic mechanisms. *Curr. HIV. Res.* 9: 554-567.
- McDonald, D., Vodicka, M.A., Lucero, G., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., Emerman, M., Hope, T.J. (2002): Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J. Cell Biol.* 159: 441-452.
- Monroe, E.B., Kang, S., Kyere, S.K., Li, R., Prevelige, P.E., Jr. (2010): Hydrogen/deuterium exchange analysis of HIV-1 capsid assembly and maturation. *Structure* 18: 1483-1491.
- Morellet, N., Jullian, N., De Rocquigny, H., Maigret, B., Darlix, J.L., Roques, B.P. (1992): Determination of the structure of the nucleocapsid protein NCp7 from the human immunodeficiency virus type 1 by <sup>1</sup>H NMR. *EMBO J.* 11: 3059-3065.
- Morita, E., Sundquist, W.I. (2004): Retrovirus budding. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 395-425.
- Mortuza, G.B., Haire, L.F., Stevens, A., Smerdon, S.J., Stoye, J.P., Taylor, I.A. (2004): High-resolution structure of a retroviral capsid hexameric amino-terminal domain. *Nature* 431: 481-485.
- Mortuza, G.B., Dodding, M.P., Goldstone, D.C., Haire, L.F., Stoye, J.P., Taylor, I.A. (2008): Structure of B-MLV capsid amino-terminal domain reveals key features of viral tropism, gag assembly and core formation. *J. Mol. Biol.* 376: 1493-1508.

- Mortuza, G.B., Goldstone, D.C., Pashley, C., Haire, L.F., Palmarini, M., Taylor, W.R., Stoye, J.P., Taylor, I.A. (2009): Structure of the capsid amino-terminal domain from the betaretrovirus, Jaagsiekte sheep retrovirus. *J. Mol. Biol.* 386: 1179-1192.
- Murray, P.S., Li, Z., Wang, J., Tang, C.L., Honig, B., Murray, D. (2005): Retroviral matrix domains share electrostatic homology: models for membrane binding function throughout the viral life cycle. *Structure.* 13: 1521-1531.
- Nermut, M.V., Hockley, D.J., Bron, P., Thomas, D., Zhang, W.H., Jones, I.M. (1998): Further evidence for hexagonal organization of HIV gag protein in prebudding assemblies and immature virus-like particles. *J. Struct. Biol.* 123: 143-149.
- Obr, M. (2010): Strukturně funkční studie kapsidového proteinu Mason-Pfizerova opičího viru. Bakalářská práce, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha.
- Obr, M. (2012): Vliv mutací kapsidového proteinu na skládání virových částic Mason-Pfizerova opičího viru. Diplomová práce, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha.
- Ono, A., Demirov, D., Freed, E.O. (2000): Relationship between human immunodeficiency virus type 1 Gag multimerization and membrane binding. *J. Virol.* 74: 5142-5150.
- Ono, A., Ablan, S.D., Lockett, S.J., Nagashima, K., Freed, E.O. (2004): Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101: 14889-14894.
- Orlova, M., Yueh, A., Leung, J., Goff, S.P. (2003): Reverse transcriptase of Moloney murine leukemia virus binds to eukaryotic release factor 1 to modulate suppression of translational termination. *Cell* 115: 319-331.
- Paquette, J.S., Fortin, J.F., Blanchard, L., Tremblay, M.J. (1998): Level of ICAM-1 surface expression on virus producer cells influences both the amount of virion-bound host ICAM-1 and human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J. Virol.* 72: 9329-9336.
- Petit, C., Giron, M.L., Tobaly-Tapiero, J., Bittoun, P., Real, E., Jacob, Y., Tordo, N., De The, H., Saib, A. (2003): Targeting of incoming retroviral Gag to the centrosome involves a direct interaction with the dynein light chain 8. *J. Cell Sci.* 116: 3433-3442.
- Pettit, S.C., Moody, M.D., Wehbie, R.S., Kaplan, A.H., Nantermet, P.V., Klein, C.A., Swanstrom, R. (1994): The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. *J. Virol.* 68: 8017-8027.
- Pornillos, O., Ganser-Pornillos, B.K., Kelly, B.N., Hua, Y., Whitby, F.G., Stout, C.D., Sundquist, W.I., Hill, C.P., Yeager, M. (2009): X-ray structures of the hexameric building block of the HIV capsid. *Cell* 137: 1282-1292.
- Pornillos, O., Ganser-Pornillos, B.K., Banumathi, S., Hua, Y., Yeager, M. (2010): Disulfide bond stabilization of the hexameric capsomer of human immunodeficiency virus. *J. Mol. Biol.* 401: 985-995.
- Pornillos, O., Ganser-Pornillos, B.K., Yeager, M. (2011): Atomic-level modelling of the HIV capsid. *Nature* 469: 424-427.
- Purdy, J.G., Flanagan, J.M., Ropson, I.J., Craven, R.C. (2009): Retroviral capsid assembly: a role for the CA dimer in initiation. *J. Mol. Biol.* 389: 438-451.
- Reil, H., Bukovsky, A.A., Gelderblom, H.R., Gottlinger, H.G. (1998): Efficient HIV-1 replication can occur in the absence of the viral matrix protein. *EMBO J.* 17: 2699-2708.
- Rhee, S.S., Hunter, E. (1990): A single amino acid substitution within the matrix protein of a type D retrovirus converts its morphogenesis to that of a type C retrovirus. *Cell* 63: 77-86.
- Rumlova-Klikova, M., Hunter, E., Nermut, M.V., Pichova, I., Ruml, T. (2000): Analysis of Mason-Pfizer monkey virus Gag domains required for capsid assembly in bacteria: role of the N-terminal proline residue of CA in directing particle shape. *J. Virol.* 74: 8452-8459.
- Saad, J.S., Miller, J., Tai, J., Kim, A., Ghanam, R.H., Summers, M.F. (2006): Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103: 11364-11369.
- Sattentau, Q.J., Weiss, R.A. (1988): The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. *Cell* 52: 631-633.



- Sfakianos, J.N., LaCasse, R.A., Hunter, E. (2003): The M-PMV cytoplasmic targeting-retention signal directs nascent Gag polypeptides to a pericentriolar region of the cell. *Traffic*. 4: 660-670.
- Stansell, E., Apkarian, R., Haubova, S., Diehl, W.E., Tytler, E.M., Hunter, E. (2007): Basic residues in the Mason-Pfizer monkey virus gag matrix domain regulate intracellular trafficking and capsid-membrane interactions. *J. Virol.* 81: 8977-8988.
- Stolp, B., Reichman-Fried, M., Abraham, L., Pan, X., Giese, S.I., Hannemann, S., Goulimari, P., Raz, E., Grosse, R., Fackler, O.T. (2009): HIV-1 Nef interferes with host cell motility by deregulation of Cofilin. *Cell Host. Microbe* 6: 174-186.
- Summers, M.F., Henderson, L.E., Chance, M.R., Bess, J.W., Jr., South, T.L., Blake, P.R., Sagi, I., Perez-Alvarado, G., Sowder, R.C., III, Hare, D.R. (1992): Nucleocapsid zinc fingers detected in retroviruses: EXAFS studies of intact viruses and the solution-state structure of the nucleocapsid protein from HIV-1. *Protein Sci.* 1: 563-574.
- Swanstrom, R., Wills, J.W. (1997): Synthesis, Assembly, and Processing of Viral Proteins. *In*: Coffin, J.M., Hughes, S.H., Varmus, H.E. (eds.): *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 263- 334.
- Tang, C., Loeliger, E., Luncsford, P., Kinde, I., Beckett, D., Summers, M.F. (2004): Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101: 517-522.
- Tang, Y., Winkler, U., Freed, E.O., Torrey, T.A., Kim, W., Li, H., Goff, S.P., Morse, H.C., III (1999): Cellular motor protein KIF-4 associates with retroviral Gag. *J. Virol.* 73: 10508-10513.
- Temin, H.M., Mizutani, S. (1970): RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226: 1211-1213.
- Ternois, F., Sticht, J., Duquerroy, S., Krausslich, H.G., Rey, F.A. (2005): The HIV-1 capsid protein C-terminal domain in complex with a virus assembly inhibitor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12: 678-682.
- Tritch, R.J., Cheng, Y.E., Yin, F.H., Erickson-Viitanen, S. (1991): Mutagenesis of protease cleavage sites in the human immunodeficiency virus type 1 gag polyprotein. *J. Virol.* 65: 922-930.
- Turner, B.G., Summers, M.F. (1999): Structural biology of HIV. *J. Mol. Biol.* 285: 1-32.
- Ulbrich, P., Haubova, S., Nermut, M.V., Hunter, E., Rumlova, M., Ruml, T. (2006): Distinct roles for nucleic acid in in vitro assembly of purified Mason-Pfizer monkey virus CANC proteins. *J. Virol.* 80: 7089-7099.
- Voevodin, A.F., Preston A.M (2009): *Simian virology*. Wiley-Blackwell, Ames, USA.
- Vogt, P.K. (1997a): Historical Introduction to the General Properties of Retroviruses. *In*: Coffin, J.M., Hughes, S.H., Varmus, H.E. (eds.): *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 1- 26.
- Vogt, V.M. (1997b): Retroviral Virions and Genomes. *In*: Coffin, J.M., Hughes, S.H., Varmus, H.E. (eds.): *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA, 27- 70.
- von Schwedler, U.K., Stemmler, T.L., Klishko, V.Y., Li, S., Albertine, K.H., Davis, D.R., Sundquist, W.I. (1998): Proteolytic refolding of the HIV-1 capsid protein amino-terminus facilitates viral core assembly. *EMBO J.* 17: 1555-1568.
- von Schwedler, U.K., Stray, K.M., Garrus, J.E., Sundquist, W.I. (2003): Functional surfaces of the human immunodeficiency virus type 1 capsid protein. *J. Virol.* 77: 5439-5450.
- Vranken, W.F., Boucher, W., Stevens, T.J., Fogh, R.H., Pajon, A., Llinas, M., Ulrich, E.L., Markley, J.L., Ionides, J., Laue, E.D. (2005): The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* 59: 687-696.
- Wieggers, K., Rutter, G., Kottler, H., Tessmer, U., Hohenberg, H., Krausslich, H.G. (1998): Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites. *J. Virol.* 72: 2846-2854.
- Wildova, M., Hadravova, R., Stokrova, J., Krizova, I., Ruml, T., Hunter, E., Pichova, I., Rumlova, M. (2008): The effect of point mutations within the N-terminal domain of Mason-

- Pfizer monkey virus capsid protein on virus core assembly and infectivity. *Virology* 380: 157-163.
- Worthylake, D.K., Wang, H., Yoo, S., Sundquist, W.I., Hill, C.P. (1999): Structures of the HIV-1 capsid protein dimerization domain at 2.6 Å resolution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 55: 85-92.
- Wright, E.R., Schooler, J.B., Ding, H.J., Kieffer, C., Fillmore, C., Sundquist, W.I., Jensen, G.J. (2007): Electron cryotomography of immature HIV-1 virions reveals the structure of the CA and SP1 Gag shells. *EMBO J.* 26: 2218-2226.
- Yamashita, M., Emerman, M. (2005): The cell cycle independence of HIV infections is not determined by known karyophilic viral elements. *PLoS. Pathog.* 1: e18.
- Zhang, Y., Barklis, E. (1997): Effects of nucleocapsid mutations on human immunodeficiency virus assembly and RNA encapsidation. *J. Virol.* 71: 6765-6776.